

**Automatisierter Nachweis von rezipienten Zellen nach
gegengeschlechtlicher Knochenmark- bzw.
Blutstammzelltransplantation mit Hilfe von FISH**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich–Schiller–Universität Jena

von Jörn Erlecke

geboren am 19.01.1975 in Überlingen

Gutachter

1. PD Dr. Thomas Liehr, Jena
2. PD Dr. Herbert G. Sayer, Jena
3. PD Dr. Irmgard Verdorfer, Innsbruck/Österreich

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
3	Ziele der Arbeit	6
4	Material	7
4.1	Untersuchungsmaterial und Patientencharakteristika	7
4.2	Reagenzien für die Kultivierung von Lymphozyten und für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	9
4.2.1	FISH-Sonden	10
4.3	Medien, Puffer, Lösungen und Sonstiges	10
4.4	Geräte	11
4.4.1	Mikroskope und Zubehör	11
4.4.2	Weitere Geräte	12
5	Methoden	13
5.1	Kultivierung der Leukozyten	13
5.2	Herstellung von Zellkernpräparaten	13
5.3	Pepsinbehandlung, Postfixieren und Denaturieren	14
5.4	Vorbereitung des Sondenmix und Hybridisierung	14
5.5	Posthybridisierungswaschung und Gegenfärbung	14
5.6	Prozess-Parameter der MetaCyte-Software für die Zellkern- und Signalerfassung mit X- und Y-FISH-Sonden mit Metafer	15
5.7	Strategie der Fallanalyse	16
5.8	Auswertung von FISH-Präparaten am Fluoreszenzmikroskop	17

6	Ergebnisse	19
6.1	Optimierung der automatisierten Zellkernerfassung	19
6.1.1	Fokus- und Belichtungsparameter	19
6.1.2	Parameter für die Zellkernerfassung	19
6.1.3	Beschleunigte Zellkernerfassung	22
6.2	Bestimmung der Nachweisgrenzen	24
6.2.1	Nachweisgrenze für XX- und XY-Zellen	24
6.2.2	Die Abhängigkeit der Nachweisgrenze von der Stichprobengröße	26
6.2.3	Die Fehlerrate für falsch eingestufte positive und negative Zellen mit Trisomie 8	27
6.2.4	Nachweisgrenze für rezipiente Zellen mit Trisomie 8	28
6.2.5	Die Fehlerrate für falsch eingestufte positive und negative Zellen mit BCR/ABL-Genfusion	30
6.2.6	Nachweisgrenze für rezipiente Zellen mit BCR/ABL-Genfusion	31
6.3	Quantifizierung und Charakterisierung der rezipienten Zellen in Patientenproben nach Transplantation	33
6.3.1	Verteilung des Patientenkollektivs nach FISH-Chimärismusanalyse	33
6.3.2	Rezipiente Zellen mit und ohne Tumormarker	37
6.3.3	Tumormarker-negativ rezipiente Zellen und klinischer Verlauf	38
6.3.4	Tumormarker-positiv rezipiente Zellen und klinischer Verlauf	40
7	Diskussion	44
8	Schlußfolgerungen	53
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	54
10	Abkürzungen	62
	Anhang	64
	- Übersicht des posttransplantären Chimärismusstatus aller Patienten	64
	- Danksagung	66
	- Lebenslauf	67
	- Ehrenwörtliche Erklärung	68

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine automatisierte Auswertung von Interphasekern-FISH-Präparaten für die Chimärismusanalyse nach gegengeschlechtlicher Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation etabliert. Hatten die ursprünglichen Tumorzellen eine BCR/ABL-Fusion bzw. Trisomie 8, wurde geprüft, ob die simultane Darstellung der Gonosomen (XX oder XY) und des Tumormarkerstatus die Sensitivität und Aussagekraft der Untersuchung erhöht.

Nach Optimierung der Analyseparametern wurde eine robuste und sensitive automatische Chimärismusanalyse erreicht, die sich als eine standardisierbare objektive Auswertungsmethode erwies. Dabei konnten mit einer 200-fachen Vergrößerung 3000 Zellkerne in 67 Minuten automatisch auf ihren Gonosomenstatus hin analysiert werden. Die Nachweisgrenze für XX- und XY-Zellen betrug bei 3000 untersuchten Zellkernen 0,6% und 1,2%. Die Nachweisgrenze für Rezipientenzellen mit einem Tumormarker errechnet sich aus der Falschpositivrate für XX/XY und dem Tumormarker und betrug theoretisch 0,005% für XX+Trisomie 8 bzw. XX+BCR/ABL und 0,003% für XY+Trisomie 8 bzw. XY+BCR/ABL. Bei 58 Patienten (454 Proben) wurde mit der etablierten Methode der Anteil der Rezipientenzellen bzw. Tumorzellen ermittelt. Dabei zeigten 13 Patienten <4% Rezipientenzellen und 12 Patienten >4% Rezipientenzellen. Patienten mit <4% Rezipientenzellen hatten eine höhere (48 vs. 34 Monate) Überlebenschance nach einer Transplantation. Bei 7 Patienten konnten insgesamt 25 tumormarker-positive Rezipientenzellen (zwischen 0,1-1,3%) nachgewiesen werden. Ihr Nachweis erfolgte bei 5 Patienten ohne Rezidiv (Beobachtungszeitraum 16-48 Monate) und bei 2 Patienten 4 Monate vor einem Rezidiv. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass der Nachweis von tumormarker-positiven Zellen im Bereich um 0,1-1,3% kein eindeutiger Hinweis auf ein Rezidiv ist. Ausschließlich tumormarker-negative Rezipientenzellen wurden bei 2 Patienten (Beobachtungszeitraum 19 bzw. 33 Monate) zu einem Anteil von 2,8% bzw. 3,3% gefunden, ohne dass deren Auftreten zu einem Rezidiv führte. Die definierte Herkunft von tumormarker-negativen Rezipientenzellen bleibt weiter unklar. Letztendlich ist die automatisierte Auswertung von Interphasekern-FISH-Präparaten eine Möglichkeit, um tumormarker-positive Rezipientenzellen nachzuweisen. In größeren Studien sollte untersucht werden, ob ihr Auftreten zur Früherkennung eines Rezidivs herangezogen werden kann.

2 Einleitung

Transplantationen haben heute als Therapieverfahren in der Medizin einen festen Platz eingenommen. Die Bezeichnung Transplantation kommt aus dem Lateinischen (transfere = übertragen), wobei das Transplantat aus Zellen, Geweben, Organen oder Gliedmaßen bestehen kann. In der Regel sind heute dafür spezialisierte Transplantationszentren etabliert. Nach Herkunft des Transplantates unterscheidet man nach Ostendorf et al. (1997) und Schwenzer und Ehrenfeld (2002) die autologe (Spender und Empfänger sind dieselbe Person), syngene (Spender ist der eineiige Zwilling) und allogene Transplantation (Spender gehört der gleichen Art an). Die meisten Transplantationen sind Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantationen. Damit werden hauptsächlich Patienten mit Leukämien (Kolb 1998), Malignomen oder Prä malignomen des hämatopoetischen Systems, Osteopetrosen und andere ins Knochenmark metastasierende Tumoren behandelt (Delbrück 2001, Kolb et al. 2003, Ewing Bartz 2004).

Die ersten Ansätze der Bluttransplantation sind in der griechischen Mythologie genannt. Schon in der Antike spielten die Säfte des Körpers eine wichtige Rolle. Das Verständnis von Krankheit bei Hippokrates war die Imbalance der Körpersäfte Blut, Schleim, schwarzer und gelber Galle. Man hatte die Vorstellung, durch den Austausch von Blut Krankheiten heilen zu können. Medea, die Tochter des Königs Äetes, versuchte so, durch einen Zaubertrank mit einem intravenösen Zugang das Blut Jasons, ihres Mannes, aufzufrischen (Delbrück 2001). 1922 konnte Fabricius-Moeller, ein dänischer Wissenschaftler, zeigen, dass man durch Abschirmung des Röhrenknochens bei gleichzeitiger Exponierung mit einer letalen Strahlendosis die ansonsten tödliche Knochenmarkaplasie vermeiden kann. Die Injektion von Milzzellen schützt vor den Folgen der Bestrahlung. Durch die Injektion von Vorläuferzellen kann die durch Bestrahlung zerstörte Hämatopoese supplementiert werden (Lornez et al. 1951). Erst Barnes und Loutit machten 1955 erste Beobachtungen bzgl. der Überlebenszeit nach Bestrahlung. Sie stellten im Tierversuch fest, dass Tiere, die nach Bestrahlung syngene also 100%ig allogene Milzzellen von Zwillingstieren bekamen, länger überlebten als Tiere, die allogene Zellen (von fremden Tieren) erhielten (Regn 2002). Diese Beobachtung wurde 1958 durch Dausset, der das HLA-Prinzip entdeckte, systematisiert. Dies waren wichtige Schritte im Hinblick auf die Gewebeverträglichkeit.

Santos führte 1968 zusätzlich zur Ganzkörperbestrahlung (TBI = total body irradiation) Busulphan und Cyclophosphamid für die Konditionierung vor KMT für Patienten mit AML ein.

Heute werden geeignete Spender nach dem HLA-Status ausgewählt. HLA ist die Abkürzung für human leucocyte antigen, zu deutsch Haupthistokompatibilitätskomplex. Damit werden hochindividuelle Peptid-Muster auf Oberflächen kernhaltiger Zellen des menschlichen Körpers bezeichnet. Die HLA-Identität spielt die Schlüsselrolle bei der Erkennung von Zellen als körpereigen oder körperfremd. Die Stammzellen des Transplantates ersetzen das Immunsystem des Empfängers, welches zuvor chemotherapeutisch und/oder durch Bestrahlung vernichtet wurde. T-Lymphozyten aus dem Transplantat erkennen den Empfängerorganismus als fremd und reagieren mit einer Immunantwort (Goker et al. 2001). Folge der Immunantwort ist die Abstoßungsreaktion, die GvHD (graft-versus-host-disease). Eine akute GvHD kann innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation auftreten. Typische Zeichen sind sich ausbreitende Hautrötung an Händen und Füßen mit möglicher Blasenbildung und Schälung der Haut. Ebenso kann der Magen-Darm-Trakt involviert sein. Die chronische GvHD tritt erst drei Monate nach Transplantation auf. Sie wird in vier Schweregrade eingeteilt. Die Symptome sind ähnlich denen der akuten Form. Zusätzlich sind allerdings noch die Tränendrüsen, die Speicheldrüsen und die Schleimdrüsen des Magen-Darm-Traktes mit betroffen (Glucksberg et al. 1974, Goker et al. 2001). Die GvHD ist in der Regel eine Komplikation und somit ein Gesundheitsrisiko für den Patienten. Um der GvHD vorzubeugen, werden die Patienten mit Immunsuppressiva behandelt. Zur Anwendung kommen standardmäßig Cyclosporine und Methotrexate (Sayer et al. 2003a). Dabei steigt allerdings das Risiko, an Infektionen zu erkranken, meist durch Erreger, die für den gesunden Organismus harmlos sind. Die Immunsuppression muss individuell auf jeden einzelnen Patienten abgestimmt werden (Washe und Bishop 2004). Eine leichte GvHD kann auch therapeutisch genutzt werden. Sie wird dann als GvL (graft-versus-leukemia) bezeichnet. Bei einer GvL werden eventuell noch vorhandene Tumorzellen, die chemotherapeutisch nicht abgetötet wurden, von den Spenderzellen angegriffen und zerstört. Diesem Prinzip geht eine Konditionierung mit geringerer Dosis und damit geringerer Belastung voraus, die dadurch auch Patienten im höheren Alter (> 50 Jahren) eine Transplantation ermöglicht (Zeiser et al. 2005). In der Literatur wird dieses Verfahren unter anderem als metakine

Konditionierung bezeichnet (Stoetzer et al. 2001, Das et al. 2003, Kim et al. 2007, Schmid und Kolb 2007). Dabei wird eine inkomplette Tumorzelleradikation in Kauf genommen und mittels GvL eine Kontrolle der Tumorzellen angestrebt. Durch den GvL-Effekt ist das Rezidivrisiko niedriger (Bertz et al. 2002).

Der Spender und Empfänger müssen nicht das gleiche Geschlecht haben, da die Übereinstimmung im HLA-System und nicht die Übereinstimmung der Geschlechter ausschlaggebend für den Erfolg einer Transplantation ist. Im Gegenteil, eine gegengeschlechtliche Transplantation hat den Vorteil, dass die Zellen posttransplantärer Kontrollproben aufgrund des Geschlechtsmerkmals einfacher dem Spender oder dem Empfänger zuzuordnen sind. Das wird in der Routinediagnose mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersucht und als Chimärismusanalyse (griech. Chimäre = Individuum aus genetisch unterschiedlichen Teilen) bezeichnet (Lawler et al. 1984, Durnam et al. 1989, Wessman et al. 1993). Chimärismusanalysen sind in der Literatur vielfach zur posttransplantären Verlaufskontrolle verwendet worden. Es hat sich herausgestellt, dass sie einen wichtigen diagnostischen Baustein im Klinikalltag darstellen (Nakao et al. 1999, Dubovsky et al. 1999, Mattsson et al. 2001, Hancock et al. 2003). Die Chimärismuskontrollen sollten in engen monatlichen Intervallen durchgeführt werden (Bader et al. 1997, Wäsch et al. 2000), da sie eine Abschätzung des Therapieerfolges und damit die individuelle posttransplantäre Therapieplanung ermöglichen (Barrios et al. 2003).

Bei der FISH werden bestimmte DNA-Abschnitte in Zellkernen markiert und mikroskopisch analysiert (Pinkel et al. 1986). Bei der FISH-Chimärismusanalyse werden DNA-Abschnitte der X- und Y-Chromosomen markiert, sodass für jede einzelne Zelle das Geschlecht bestimmt werden kann (Gebhart et al. 1995). Durch Auszählen der jeweiligen Anzahl von Kernen lässt sich so der Anteil weiblicher und männlicher Zellkerne angeben. Diese Auszählung wird manuell am Mikroskop durchgeführt. Der Vorgang ist sehr zeitintensiv (circa 2,5 Stunden für 3000 Zellen) und erfordert ein geübtes Auge (Pinkel et al. 1986). Um das zu umgehen, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit unter anderem die Etablierung einer automatischen FISH-Analyse, um das Verhältnis von Spender- und Empfängerzellen zu bestimmen.

Eine Chromosomenanalyse mittels FISH ist bereits eine etablierte Methode in der Leukämiediagnostik. Bestimmte Chromosomenaberrationen weisen nämlich auf

bestimmte Leukämietypen hin oder sind anerkannte Marker für die Beurteilung der Prognose und damit für die Therapiestratifizierung (Huret 2008). Es gibt mehrere hundert Chromosomen- bzw. Genveränderungen, die mittels FISH nachgewiesen werden können. Die bekannteste Aberration ist die BCR/ABL-Genfusion. Man findet sie bei über 95% der chronisch myeloischen Leukämien (CML) (Cilloni et al. 2002, Gribble et al. 2003). Der Nachweis der BCR/ABL-Genfusion mittels FISH wird zur Diagnose der CML verwendet (Akel et al. 2003). Ein weiterer Tumormarker ist die Trisomie 8, welche bei 11% der akuten myeloischen Leukämien (AML) zu finden ist (Udayakumar et al. 2007) und bei allen Subtypen auftritt (Amiel et al. 1996). Hierbei werden DNA-Sonden eingesetzt, die Mutationen bzw. Chromosomenveränderungen (sog. Tumormarker) in den Tumorzellen aufzeigen.

Der gemeinsame Nachweis von Tumormarker und geschlechtsspezifischem Marker nach gegengeschlechtlicher Transplantation ermöglicht, rezipiente Tumorzellen sehr sicher zu identifizieren. Dieses Vorgehen wurde schon von Nagler et al. (1994) empfohlen, um eine bessere Abschätzung der minimalen Resterkrankung zu ermöglichen. Dieser kombinierte Nachweis ist sogar erforderlich, wenn man bei einem inkompletten Chimärismus entscheiden möchte, ob die Empfängerzellen mit dem malignen Zellklon identisch sind oder ob sie potentiell benigne Zellen darstellen. Die genauere Differenzierung von Empfängerzellen mittels Tumormarker ist in der Literatur bisher wenig beschrieben (Tamura et al. 2000, Thiele et al. 2002, Führer et al. 2005). Deshalb ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Empfängerzellen (rezipiente Zellen) bei Patienten mit inkomplettem Chimärismus mittels Simultanhybridisierung von Gonosomen-DNA (X- und Y-Chromosomen) und Tumormarkergenen (BCR/ABL-Genfusion oder Trisomie 8) zahlenmäßig genauer zu erfassen und zu differenzieren, ob der Tumormarker vorliegt.

3 Ziele der Arbeit

Bei Patienten, die eine gegengeschlechtliche Knochenmark- bzw. Blutstammzelletransplantation erfahren haben, wird zur Erfolgsabschätzung der Transplantation und zur weiteren Therapieplanung eine Chimärismusanalyse durchgeführt (Elmaagacli 2007). Dabei zeigte sich, dass bei einigen Patienten eigene Zellen (rezipiente Zellen) in geringen Mengen nachgewiesen werden können, wobei unklar ist, ob die rezipienten Zellen benigne oder maligne Zellen darstellen (Shimoni et al. 2002). Dies deckt sich auch mit Beobachtungen der Arbeitsgruppe für Tumorgenetik am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die bisher manuell durchgeführte quantitative Erfassung von rezipienten Zellen durch einen technischen Assistenten ist aufwendig und zeitintensiv. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war daher:

1. Die Etablierung einer automatisierten FISH-Analyse für die Erfassung von männlichen und weiblichen Zellen in großer Anzahl nach gegengeschlechtlicher Transplantation. Dies beinhaltet die Etablierung von Software-Parametern für die Zellkernerkennung mittels des Analysesystems Metafer und der Software MetaCyte. Eine statistische Analyse sollte die Möglichkeiten und Grenzen der Methode aufzeigen.
2. Die Etablierung einer FISH-Analyse zur Darstellung der Tumormarker in rezipienten Zellen.
3. Die Erfassung der Anzahl rezipienter Zellen in asservierten Patientenproben nach Stammzelltransplantation zu verschiedenen Verlaufskontrollzeitpunkten mittels der FISH-Technik.
4. Die Erfassung der Anteile rezipienter Zellen mit und ohne Tumormarker in den unter Punkt 3 gefundenen Proben mit rezipienten Zellen.

4 Material

4.1 Untersuchungsmaterial und Patientencharakteristika

Das Untersuchungsmaterial wurde im Zeitraum von Dezember 1995 bis Dezember 2006 im Institut für Humangenetik und Anthropologie Jena zur Chimärismusanalyse eingesandt.

Im Kollektiv befanden sich ausschließlich gegengeschlechtlich transplantierte Patienten (28 weibliche und 30 männliche). 24 Patienten waren an einer AML, 16 an einer CML, 5 an einer ALL, 4 an einem Plasmozytom, 3 an einer aplastischen Anämie, 2 an MDS und jeweils 1 Patient an einem NHL, einer CLL, einem Lymphom bzw. einer Osteopetrose erkrankt. Die Vorbereitung (Konditionierung) erfolgte bei 30 Patienten metakin (Busulfan/Fludarabin/ATG), bei 23 klassisch (TBI/Cyclophosphamid) und bei 5 ist die Konditionierung unbekannt. Alle erhielten eine Knochenmarktransplantation (KMT) (n=4) oder eine periphere Blutstammzelltransplantation (PBSCT) (n=54). Bei 40 Patienten war der Spender HLA identisch. Bei 14 nicht HLA identisch und bei 4 Patienten war der HLA-Status unbekannt. Bei 29 Patienten war der Spender ein Familienmitglied, bei 26 war es ein Fremdspender und bei 3 Patienten unbekannt. Das mittlere Alter bei Transplantation betrug 46 Jahre (jüngstes Transplantationsalter: 2 Monate; ältestes Transplantationsalter: 89 Jahre). Bei 46 Patienten war vor der Transplantation kein zytogenetischer Tumormarker identifiziert worden, wobei 12 Patienten einen bekannten Tumormarker vorwiesen. Die Anzahl verstorbener Patienten im Betrachtungszeitraum beträgt 19. Todesursache war bei der Hälfte (9) der verstorbenen Patienten ein Rezidiv, 3 Patienten verstarben an einer GvHD, 4 an einer Infektion und bei 3 Patienten ist die Todesursache unklar. Der Median liegt bei 11 Monaten (2-33 Monate) nach Transplantation. Tabelle 1 zeigt die Zusammenfassung der Patientencharakteristika.

Die verwendeten klinischen Daten der Patienten wurden den Patientenakten entnommen. Die Verwendung dieser Daten ist von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Antrag Nr. 1330-06/04) für die hier durchgeführte Arbeit genehmigt worden.

Tabelle 1: Patientencharakteristika

Patienten Nr.	Ge-schlecht	Grunder-krankung	Tx Alter	Konditio-nierung	PBT/ KMT	Spender	HLA	tot	Tot n. Tx Monate	Ursache Tod	zytogen. Marker	Anzahl unter-suchte Proben
1	m	aA	10	n.b.	PBT	A	id	ja	6	n.b.	n.b.	1
2	f	AML	62	M	PBT	A	id	nein	19	GvHD	n.b.	6
4	f	CML	51	K	PBT	A	nid	ja			bek.	2
5	m	MDS	37	M	PBT	F	id	nein			n.b.	5
6	f	AML	44	M	PBT	F	id	nein			n.b.	3
7	f	ALL	43	K	KMT	F	n.b.	nein			n.b.	5
8	f	NHL	39	M	PBT	A	id	nein			n.b.	19
9	f	CML	25	K	PBT	F	nid	nein			n.b.	21
10	f	AML	49	K	PBT	A	nid	nein			n.b.	3
11	f	PZ	57	K	PBT	n.b.	n.b.	nein			n.b.	7
12	f	CML	12	n.b.	PBT	A	id	ja	4	n.b.	n.b.	3
13	f	CML	43	n.b.	PBT	n.b.	n.b.	nein			n.b.	1
14	m	OP	0	n.b.	KMT	F	id	nein			n.b.	4
15	f	AML	41	M	PBT	F	id	nein			bek.	17
16	m	aA	49	M	PBT	F	id	nein			n.b.	18
17	f	AML	55	M	PBT	A	nid	ja	15	Infektion	n.b.	3
18	m	PZ	40	M	KMT	A	id	ja	9	Rezidiv	n.b.	8
19	f	AML	48	M	PBT	A	id	ja	4	Rezidiv	n.b.	3
20	m	PZ	60	M	PBT	A	id	ja	3	Infektion	n.b.	2
21	f	AML	25	M	PBT	F	id	nein	3	GvHD	n.b.	15
22	m	ALL	34	K	PBT	F	id	ja			n.b.	1
23	m	CML	39	K	PBT	A	id	nein			bek.	3
24	f	MDS	52	M	PBT	F	id	nein			n.b.	15
25	f	CML	1	n.b.	KMT	A	id	nein			n.b.	3
26	f	ALL	14	K	PBT	F	id	ja	12	n.b.	n.b.	2
27	m	AML	89	M	PBT	A	nid	nein	4	Infektion	n.b.	4
28	f	AML	49	K	PBT	F	nid	nein			n.b.	14
29	f	AML	48	M	PBT	A	nid	ja			n.b.	2
30	m	CML	49	K	PBT	F	id	ja			bek.	16
31	m	AML	58	M	PBT	A	id	nein			n.b.	8
32	f	CML	46	K	PBT	A	id	nein	10	Rezidiv	bek.	14
33	m	ALL	42	M	PBT	F	nid	nein			n.b.	12
34	m	CML	46	K	PBT	n.b.	n.b.	nein			n.b.	6
35	m	CML	51	M	PBT	F	id	nein			bek.	3
37	m	AML	48	M	PBT	A	id	ja			bek.	7
38	m	CML	43	M	PBT	F	id	nein			bek.	22
39	f	CML	38	K	PBT	F	id	nein			bek.	14
40	f	AML	34	K	PBT	F	id	nein			n.b.	21
41	f	AML	53	M	PBT	F	id	nein			n.b.	12
42	f	AML	59	M	PBT	F	id	nein			n.b.	25
43	m	CML	50	M	PBT	F	nid	ja	3	Rezidiv	bek.	3
44	f	AML	58	M	PBT	A	id	nein	15	Rezidiv	n.b.	7
45	m	AML	27	K	PBT	F	nid	ja			n.b.	7
47	m	CML	52	M	PBT	F	id	nein			bek.	9
48	f	CML	44	K	PBT	F	id	nein			bek.	9
49	m	AML	46	K	PBT	F	id	nein	16	Rezidiv	n.b.	6
50	m	AML	40	K	PBT	A	nid	ja			n.b.	7
51	m	AML	50	M	PBT	F	id	nein			bek.	17
52	f	AML	50	M	PBT	F	id	nein			n.b.	10
53	f	AML	61	M	PBT	A	id	ja	10	Rezidiv	n.b.	5
54	m	ALL	66	M	PBT	F	id	ja	23	Rezidiv	n.b.	3
55	m	CLL	58	M	PBT	A	nid	ja	20	Infektion	n.b.	4
56	m	PZ	49	M	PBT	A	id	nein	13	Rezidiv	n.b.	5
57	m	Lym	45	K	PBT	A	id	ja			n.b.	3
58	m	aA	35	K	PBT	A	id	nein			n.b.	3
60	m	CML	37	K	PBT	A	nid	nein			n.b.	2
61	f	AML	20	K	PBT	A	nid	nein			n.b.	3
62	f	ALL	26	K	PBT	F	id	nein			n.b.	4

Darstellung der individuellen Patientendaten: m = männlich, f = weiblich, M = metakin (Flu/Bu/AT), K = klassisch (TBI/Cyclo); A = Fremdspender, F = Familienspender; id = identisch, nid = nicht identisch, aA = aplastische Anämie, PZ = Plasmozytom, Lym = Lymphom, CML = chronisch myeloische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CLL = chronisch lymphatische Leukämie, ALL = akute lymphatische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom, OP = Osteopetrose, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, bek. = bekannt, n.b. = nicht bekannt, KMT = Knochenmarktransplantation; PBT = periphere Blutstammzelltransplantation; Tx = Transplantation.

4.2 Reagenzien für die Kultivierung von Lymphozyten und für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Tabelle 2: Für die Kultivierung von Lymphozyten und die Fluoreszenz in situ Hybridisierung benötigte Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration/Zusammensetzung/ Beschreibung
Für die Lymphozytenpräparation		
Colcemid	Seromed	0,1 µg/ml Endkonzentration
Fixativ	Roth Merck	Eisessig (100%) Methanol - Verhältnis der Gebrauchslösung: Eisessig : Methanol = 1:3
Kaliumchloridlösung (KCl)	Merck	56g/ml KCl Gebrauchslösung
Nährmedium	Gibco BRL Biochrom KG Biochrom KG	RPMI 1640 mit Glutamax-Zusatz L-Alanin und L-Glutamin Fetales Kälberserum 12% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 mg/ml) 1%
Phytohämagglutinin PHA	Seromed	1,2 mg lyophilisiertes PHA in 5 ml Aqua ad injectabilia lösen
Für die FISH		
20xSSC	Roth Merck	87,65 g NaCl 44,10 g Natriumcitrat ad 500 ml Aqua dest.
Ethanol	J.T.Baker	95-100% Stammlösung
Fixogum, Rubber Cement	Marabu	Elastischer Kleber zum Abdichten der Hybridisierungsfelder
Formamid (pH 7,0)	Merck	
HCl	Merck	37 % Stammlösung (1M) 1 mM Gebrauchslösung
Cot Human DNA	Roche	1 µg/µl Stammlösung
Marvel		zu 99% fettfreies Milchpulver
MgCl ₂	Merck	1 M Stammlösung
Paraformaldehyd	Sigma	0,02 g/ml 1xPBS Stammlösung
Pepsin	Sigma	2500 U/mg Substanz 0,02 g/ml Aqua dest. Stammlösung
Phosphatpuffer	Merck	0,5 M Na ₂ HPO ₄ + 0,5 M NaH ₂ PO ₄

4.2.1 FISH-Sonden

Tabelle 3: Zur Hybridisierung verwendete Sonden

Sonde	Hersteller/Ort
Cep X in SpectrumOrange/TRITC	Abbott, Wiesbaden
Y Sat III in SpectrumGreen/FITC	Abbott, Wiesbaden
Y Sat III in TexasRed	bereitgestellt durch Dr.Angela Nietzel, Institut f. Humangenetik, Jena
Cep 8 in SpectrumAqua	bereitgestellt durch Dr.Anita Heller, Institut f. Humangenetik, Jena
BCR/ABL-ES	Abbott, Wiesbaden
Puffer	
Cep-Puffer	Abbott, Wiesbaden
LSI-Puffer	Abbott, Wiesbaden

4.3 Medien, Puffer, Lösungen und Sonstiges

Tabelle 4: Benutzte Medien, Puffer, Lösungen und Sonstiges

Bezeichnung	Zusammensetzung (Hersteller)	Beschreibung
0,4xSSC (pH 7,0)	10 ml 20x SSC 490 ml Aqua dest.	Posthybridisierungswaschung
2xSSC (pH 7,0)	50 ml 20xSSC 490 ml Aqua dest.	Posthybridisierungswaschung
4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) Vectashield Mounting Medium	2 µl DAPI-Stammlösung (50 mg/ml) 1 ml Vectashield (Vector Lab.)	Chromosomengegenfärbung
4xSSC/Tween = 4XSSCT (pH 7,0)	100 ml 20x SSC 400 ml Aqua dest. 250 µl Tween 20 (Sigma)	Posthybridisierungswaschung
50% Formamid/2xSSC (pH 7,0)	50 ml 20xSSC 200 ml Aqua dest. 250 ml Formamid	Posthybridisierungswaschung
70% Formamid/2xSSC (pH 7,0)	10 ml 20xSSC 20 ml Aqua dest. 70 ml Formamid	Denaturierung der Objektträger
Marvel/4xSSCT	0,1 g Marvel in 2 ml 4xSSCT lösen 5 min bei 1500 U/min zentri- fugieren, obere Schicht werfen	Zum Blockieren freier Bindungs- stellen nach Hybridisierung
Pepsinlösung (100 µg/ml, pH 2,0)	5 ml 0,2 N HCL 95 ml Aqua dest. 500 µl Pepsin	Verdauung störender Proteine (Vorbehandlung der Objektträger) vor Hybridisierung
Postfixierungslösung	0,5 ml 1 M MgCl ₂ 4,5 ml 1xPBS 5 ml Paraformaldehyd	Fixierung der Chromosomen nach Pepsinverdau

4.4 Geräte

4.4.1 Mikroskope und Zubehör

Zum Mikroskopieren wurde das Zeiss-Mikroskop Axioplan 2 imaging verwendet, welches mit verschiedenen Filtern der Firmen AHF, Tübingen und Zeiss, Jena ausgestattet war. Zur Bildaufnahme wurde eine CCD Kamera (CV-M1, 1280x1024 Pixel) der Firma Jai Glostrup, Dänemark verwendet. Das Mikroskop war mit der Software MetaCyte der Firma MetaSystems, Altlußheim zur Bildaufnahme und -verarbeitung, gekoppelt.

Tabelle 5: Spezifikation der verwendeten Filter

Fluoreszenz-farbstoff	DAPI	FITC	TRITC	Spektrum AQUA	TexasRed	Tripleband
						DAPI FITC TRITC
Filter-Nr.	F31-000	F41-001	F41-002	F31-036	F41-004	F62-020
Anregung	300-400nm	440-520nm	485-585nm	415-455nm	505-615nm	385-400nm 475-500nm 440-570nm
Farbteiler	400nm	505nm	580nm	455nm	595nm	420nm 500nm 575nm
Sperrfilter	410-510nm	485-585nm	535-685nm	450-510nm	570-730nm	440-465nm 500-535nm 580-630nm

4.4.2 Weitere Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Herstellerbezeichnung
Wasserbad	Memmert	W200 und W320
Zentrifuge	Eppendorf	5804R
Brutschrank	Hereaus Instruments	FunktionLine
Heizplatte	Gerhardt	H22 clcc
Thermocycler	MJ Research	PTC-200
Rüttelplatte	Heidolph	Rotamax 120
Pipettierhilfe	Abimed	2, 20, 200, 1000µl
Thermomixer	Eppendorf	5437
Minishaker	IKA® Works	MS1
Kulturflaschen	Greiner	
Objektträger	Menzel	Superfrost

5 Methoden

5.1 Kultivierung der Leukozyten

Die Kultivierung der Leukozyten aus venösem Vollblut erfolgte nach Standardprotokoll (Verma und Babu 1994).

Für die Kultivierung wurden 4ml heparinisiertes Blut, 8ml Medium und 100ml Colzemid in einer Kulturflasche zusammengegeben und für 24h bei 37°C angesetzt. Danach wurden die kultivierten Zellen durch vorsichtiges Schütteln vom Boden der Kulturflasche gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurden mit 10ml einer hypotonen KCl-Lösung (0,075M) für 30 Minuten inkubiert. Die hypotone Behandlung erhöht das Zellvolumen der Leukozyten, führt zur Lyse der Erythrozytenzellmembran und erlaubt somit deren Beseitigung (Henegariu et al. 2001). Vor dem anschließenden Zentrifugieren (1500 U/min; 5 Minuten) wurde 1ml Fixativ (Methanol:Eisessig = 3:1, 4°C) dazugegeben. Um die Suspension nun von Erythrozyten und Plasmaresten zu säubern, erfolgte 3x ein Waschschriff mit folgendem Ablauf: Überstand abnehmen und verwerfen, Fixativ dazugeben und Pellet resuspendieren, Zentrifugation (1500 U/min; 5 Minuten). Danach wurde das Pellet in circa 1ml Fixativ resuspendiert. Vor dem Auftropfen auf den Objektträger (OT) wurde die Suspension für mindestens 45 Minuten auf Eis gestellt. Sie kann jahrelang bei -20°C aufbewahrt werden.

5.2 Herstellung von Zellkernpräparaten

Vorbereitend wurde der OT mit Seidenpapier gereinigt und danach in einer Küvette mit Aqua dest. bei 4-8°C für ca. 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden ca. 20ml der gut durchmischten leicht trüben Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen und aus einem Abstand von circa 1-2cm auf die noch feuchten OT aufgetropft. Der Erfolg des Auftropfens wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop mit einem Objektiv mit 100-facher Vergrößerung überprüft, um die gewünschte Zelldichte (siehe Ergebnisse) zu erreichen. Je nach Zelldichte kann die Suspension verdünnt (durch Zugabe von Fixativ) oder verdichtet werden (Zentrifugation, Abnahme von Fixativ). Die OT wurden luftgetrocknet und anschließend zum sogenannten Altern für 12h bei 60°C in einen Trockenschrank gestellt.

5.3 Pepsinbehandlung, Postfixieren und Denaturieren

Ein getrocknetes Zellplasma, das die Zellkerne auf dem Präparat umgeben kann, wirkt bei der Hybridisierung als Barriere für die FISH-DNA-Sonden. Deshalb wurde das Zellplasma mit Pepsinlösung verdaut (5-8 min, 37°C). Um die Enzymwirkung zu stoppen, wurden die OT 5 Minuten in 1xPBS inkubiert. Zum anschließenden Fixieren wurde die Postfixierungslösung für 10 Minuten auf den OT gegeben. Anschließend wurden die OT erneut gewaschen (1xPBS, 5 Minuten) und in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und dann luftgetrocknet.

Zum Denaturieren legte man die OT auf die Heizplatte (20s, 72 °C). Danach gab man 100µl der Denaturierungslösung für 3 Minuten darauf und deckte ihn mit einem Deckglas ab. Danach wurden die OT in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und luftgetrocknet.

5.4 Vorbereitung des Sondenmix und Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte nach Standardprotokoll (Pinkel et al. 1986). FISH-Sonden und Verdünnungspuffer wurden für ein leichtes Pipetieren auf 37°C erwärmt und nach Herstellerangaben gemischt. Zur Denaturierung der als Doppelstrang vorliegenden Sonden wurde der Sondenmix zuerst erwärmt (72°C, 5 Minuten) und anschließend schnell abgekühlt (4°C, 2 Minuten). Durch die schnelle Abkühlung wird eine perfekte Renaturierung verhindert. Nachdem der Sondenmix auf die OT gegeben worden war, wurden die OT mit einem Deckglas der Größe 24x60 abgedeckt und anschließend mit Fixogum abgedichtet. Durch das Bedecken und Abdichten wird das Austrocknen während der Hybridisierung verhindert. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer für circa 12h im Brutschrank bei 37°C.

5.5 Posthybridisierungswaschung und Gegenfärbung

Um unspezifisch gebundene DNA von den OT zu entfernen, wurde eine Schnellwaschung (rapid wash, 68°C, 2 Minuten, 4xSSC anschließend bei Raumtemperatur, 1 Minute, 1xSSC/Tween) durchgeführt. Danach tauchte man die OT kurz in 1xPBS und dehydrierte sie in der aufsteigende Alkoholreihe. Um das Intensitätsverhältnis Signal/Hintergrund zugunsten des Signals zu erhöhen, wurde mit DAPI, das an die DNA bindet (Wilson et al. 1990) gegengefärbt, und der OT mit einem

Deckglas abgedeckt. Die so fertigen OT konnten sofort unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mehrere Monate aufbewahrt werden.

5.6 Prozess-Parameter der MetaCyte-Software für die Zellkern- und Signalerfassung mit X- und Y-FISH-Sonden mit Metafer

Zur automatisierten Zellkernerfassung mit X- bzw. Y-FISH-Sonden am Metafer der Firma MetaSystems, Althußheim wurden zuerst die Suchparameter im sogenannten Classifier definiert. Die dazugehörige Software MetaCyte, mit der die Zellkernerfassung gemacht wird, verfügt über eine Trainingsfunktion, mit deren Hilfe die Erstellung der Prozessparameter erfolgte.

Dazu wurden zuerst Bilddaten von Proben, die von männlichen und weiblichen Probanden stammten, ohne definierte Suchkriterien zum sogenannten „Trainieren“ aufgenommen. Danach wurden im Menüpunkt „Training“ jeweils 100 auswertbare Zellkerne und deren Signale als valide markiert, wobei das System aus dieser Information den Algorithmus zur Zellkern- und Signalerkennung berechnet. Dieser Algorithmus musste durch erneute Prüfungen optimiert werden. Die Software lässt es zu, geänderte Suchkriterien virtuell auf die zuvor gespeicherten Bilddaten anzuwenden, so dass ein Absuchen des OT am Mikroskop entfällt. Für eine optimierte Zellkernerfassung wurden folgende Parameter modifiziert: Belichtungsparameter (Kapitel 6.1.1), minimal und maximal zulässige Zellkerngröße und der Schwellenwert für das Signal-/Hintergrundverhältniss (Kapitel 6.1.2). Der Parameter „Maximum Concavity Depth“ beschreibt das maximal zulässige Verhältnis der Längen – und Breitenachse eines Zellkerns und wird relativ zum Zellkerndurchmesser angegeben. Dadurch kann die Software zwischen Zellkernen, die eher oval sind, und sich berührende Zellkerne unterscheiden. Die „Maximum Concavity Depth“ wurde mit Hilfe des in MetaCyte integrierten Optimierungsprogramms bestimmt und betrug 0,4.

Bevor man mit dem „spot counting“ beginnt, ist es wichtig, Pixelfehler der Kamera zu eliminieren, da diese zu Fehlern bei der Signalerfassung führen können. Dazu wurden im Classifier für die Signalerfassung von X- und Y-Signalen zwei Filter aktiviert: Der erste ist der Median(V)-Filter, V steht für vertikal. Dieser Filter eliminiert Pixelfehler. Zweitens wurde der SBHistoMax-Filter verwendet. Beim SBHistoMax wird der häufigste Grauwert im Bild ermittelt. Der häufigste Grauwert entspricht in der Regel dem

Hintergrund. Dieser Hintergrunds-Grauwert wird dann von allen Grauwerten abgezogen mit dem Effekt eines besseren Hintergrund/Signalverhältnisses.

Zur Optimierung der Parameter zur Signalerfassung von X- und Y-FISH Signalen wurde die Optimierungsfunktion von MetaCyte verwendet. Es gibt zwei Farbkanäle zur Signalaufnahme, S1 (X-FISH Signal) und S2 (Y-FISH Signal), für die die Optimierung durchgeführt wurde. Die Vorgehensweise war wie folgt: Im Trainingsdatensatz wurden die positiven Signale in den am Anfang gewählten Zellkernen als positiv markiert. Signale, die nicht als Signale gewertet werden sollten (z.B. Hintergrund, auch Signale außerhalb von Zellkernen), konnten als negativ klassifiziert werden. Aus dieser Information errechnete die Software die Mittelwerte für eine valide Signalgröße, die minimale Signalstärke, die maximale Belichtungszeit und den Bereich für valide Signalabstände. Daraufhin wurde als nächster Schritt der Vergleich mit allen Signalen im Trainingsdatensatz mittels Optimierungsfunktion durchgeführt und die Optimalwerte durch die Software errechnet. Tabelle 7 zeigt die errechneten Werte.

Tabelle 7: Im Klassifikator eingestellte Werte zur Erfassung der Signale S1: X-FISH-Signal und S2: Y-FISH-Signal

Farbkanal	S1	S2
Signalgröße (1/100µm)	15	15
Signalstärke (%)	27	78
Signalabstand (1/10µm)	5	14
max. Belichtungszeit (s)	0,5	0,33

Somit konnten zwei Classifier erstellt werden, die entweder ein X-FISH-Signal in SpectrumOrange und Y-FISH-Signal in SpectrumGreen (für Patienten mit Tumormarker Trisomie 8) oder ein X-FISH-Signal in SpectrumAqua und Y-FISH-Signal in TexasRed (für Patienten mit Tumormarker BCR/ABL) erfassen konnten.

5.7 Strategie der Fallanalyse

Die Vorgehensweise bei der Auswertung von FISH-Präparaten gestaltete sich wie folgt: Zuerst wurde eine Chimärismusanalyse durchgeführt. Erst wenn ein Präparat auch Zellkerne des Geschlechts des Patienten aufwies, also bei einer Frau ein weiblicher und bei einem Mann ein männlicher Zellkern, wurde im zweiten Schritt untersucht, ob der

Zellkern auch den bekannten Tumormarker trug. Das war bei den MDS/AML-Fällen die Suche, ob eine Trisomie 8 vorliegt, also ob das blaue Signal 3x zu sehen war. Bei den CML-Fällen war das die Untersuchung, ob das BCR-ABL-Fusionsgen vorliegt. Das Fusionsgen wird daran erkannt, daß durch die Überlagerung der Signale SpectrumOrange und SpectrumGreen ein gelber Spot zu sehen ist. Bei Patienten ohne bekannten Tumormarker wurde nur eine Chimärismusanalyse durchgeführt. Abbildung 1 zeigt den Ablauf schematisch am Beispiel einer Patientin.

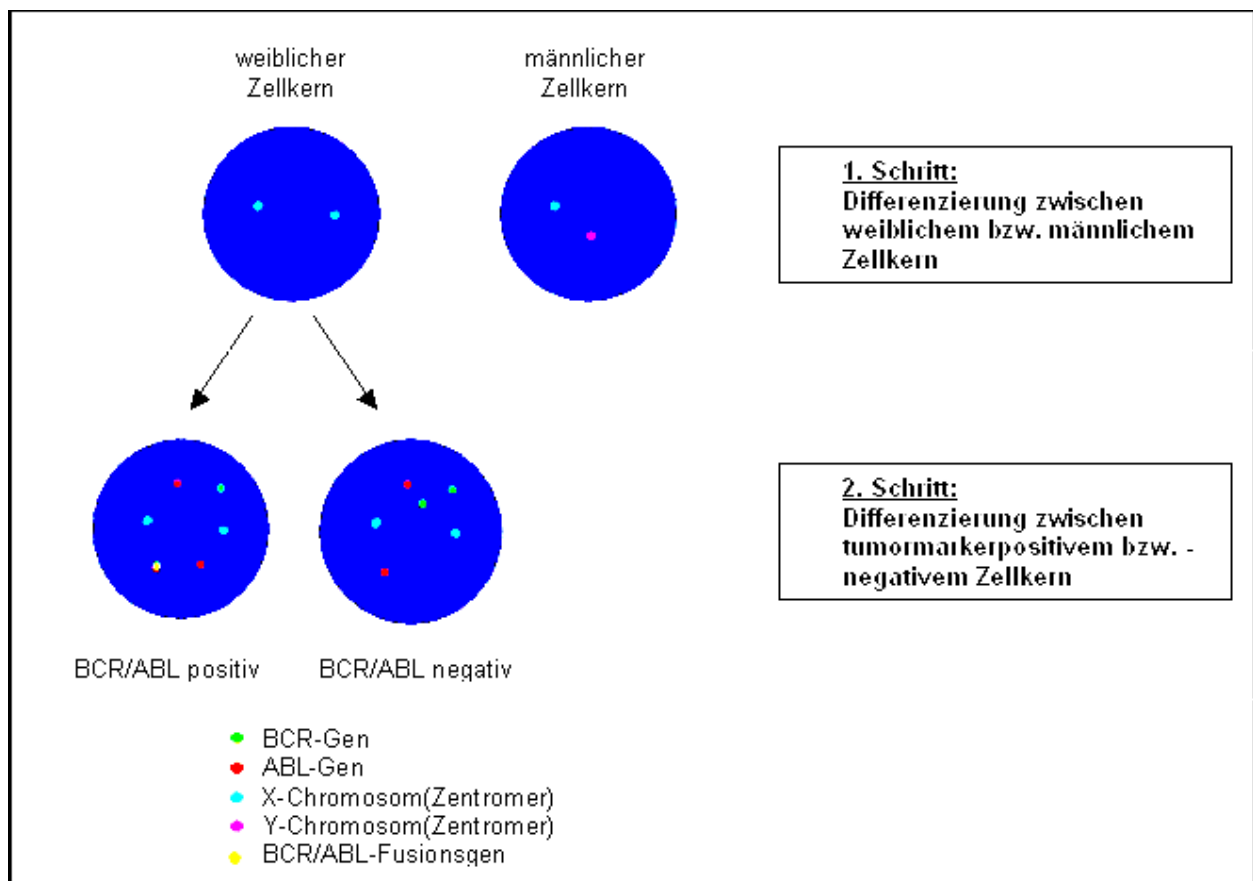


Abbildung 1: Vorgehensweise bei der Auswertung einer Probe von einem weiblichen Patienten mit CML (schematisch). 1. Schritt: Differenzierung zwischen weiblichen und männlichen Zellkernen. Beim Nachweis eines weiblichen (rezipienten) Zellkernes wird im 2. Schritt zwischen tumormarker-positiven und -negativen Zellkernen differenziert. Im Beispiel ist ein BCR/ABL-positiver sowie BCR/ABL-negativer Zellkern zu sehen. Der BCR/ABL-positive rezipiente Zellkern zeigt das gelbe Fusionssignal.

5.8 Auswertung von FISH-Präparaten am Fluoreszenzmikroskop

Die Auswertung von FISH-Präparaten erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging. Der große über Mikromotoren angetriebene Objektisch ermöglicht das

Einspannen von 8 OT, die nacheinander automatisch abgescannt wurden. Um das System effektiv zu nutzen, wurde dieser Schritt meistens nachts durchgeführt, da das System über eine automatische Abschaltung verfügt. Für jeden OT wurde das Suchfenster manuell bestimmt, indem zelllichte Areale auf dem OT aufgesucht und vier Stellen als Referenz-Eckpunkte angegeben wurden. Wenn ein OT abgescannt ist, wird im MetaCyte-Programm für jeden Signalfarbkanal ein Säulendiagramm mit der Verteilung der Signale im entsprechenden Kanal in allen gefundenen Zellkernen angezeigt. Durch Markieren der Säulen zum Beispiel mit einem roten und einem grünen Signal zeigt die Galerie alle gefundenen Zellkerne mit einem roten und einem grünen Signal an. Auf diese Weise konnten bei jedem Patienten die gewünschten Zellkerne mit entsprechender Signalkombination angezeigt werden (bei weiblichen Patienten alle männlichen Zellen und bei männlichen Patienten alle weiblichen Zellen). So wurde die Gruppe rezipienter Zellen für jeden OT in der Galerie angezeigt. Durch einfaches Anklicken jedes Zellkerns in der Galerie fährt der Objektisch an die Position des OT, auf der der Zellkern liegt. Dieser konnte dadurch manuell am Mikroskop mit den entsprechenden Filtern für Trisomie 8 (Aqua-Filter) oder BCR/ABL-Fusion (FITC- und TRITC-Filter) auf Tumormarker untersucht werden. Zellen, die nicht die typische Signalkonstellation für weiblich (XX) und männlich (XY) hatten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

6 Ergebnisse

6.1 Optimierung der automatisierten Zellkernerfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zur automatisierten Zellkernerfassung das Analysesystem MetaCyte der Firma MetaSystems verwendet. Hierfür war es erforderlich, verschiedene Analyse-Parameter für unsere Untersuchungen zu optimieren.

6.1.1 Fokus- und Belichtungsparameter

Für die Zellkernsuche wurde ein Suchfenster auf dem Objektträger manuell definiert. Innerhalb dieses Fensters war es wichtig, netzartig Messpunkte festzulegen, die als eine Art Referenzpunkt angefahren werden konnten, um die Fokusebene auszumessen und festzulegen. Zuerst wurde ein Grobfilter (Grid focus), der die näherungsweise Bestimmung vornahm, benutzt. Als Optimum erschienen 11 Fokusebenen mit einem Abstand von 50µm. Danach wurde jeder Messpunkt noch einmal mit einem Feinfokus (Fine Focus) mit 20 Fokusebenen, die einen Abstand von 0,375µm hatten, präzisiert. Dadurch konnte eine hohe Bildschärfe für die Suche von Zellkernen und FISH-Signalen erreicht werden. Die Netzweite der Messpunkte betrug 2000µm. Eine software-basierte Erhöhung der CCD-Kameraempfindlichkeit (Gain 4) erlaubte kurze Integrationszeiten und dadurch ein geringes Ausbleichen der Signale sowie schnelle Analysezeiten eines Präparates.

6.1.2 Parameter für die Zellkernerfassung

Zur Ermittlung der minimal und maximal zulässigen Zellkerngröße wurde ein Datensatz aus 2612 mikroskopischen Aufnahmen virtuell nach Zellkernen abgesucht und anschließend visuell kontrolliert. Für die untere Schwelle mit minimalen Werten von 3,5-9,5µm variierte die Summe der gefundenen Zellen im Suchfenster von 7428 bei 3,5µm bis 5181 bei 9,5µm. Ebenso variierten die gefundenen Falschzählungen, welche zum größten Teil auf Zellfragmenten beruhten, die das System als Zellkerne definierte. Bei 3,5µm wurden 358 und bei 9,5µm 22 Falschzählungen gefunden. Das gleiche

Prozedere wurde mit den Werten für die maximal zulässige Zellkerngröße durchgeführt. Hier wurden Werte von 11,2µm bis 17,8µm eingestellt. Die Anzahl der gefundenen Zellkerne schwankte bei diesen Messungen von 3629 bei 11,2µm und 7842 bei 17,8µm. Die Menge der Falschzählungen variierte von 4 Falschzählungen bei 11,2µm bis 235 bei 17,8µm, wobei es sich hier meist um Zellansammlungen handelte, die nicht als Einzelzellkerne erkannt werden konnten. Abbildung 2 zeigt die Messwerte für die von MetaCyte gefundenen Zellzahlen im Bereich 3,5-10µm für den minimalen zulässigen Zellkerndurchmesser und im Bereich von 10-19µm für den maximal zulässigen Zelldurchmesser (blaue Messpunkte). Die roten Messpunkte zeigen die Anzahl der Falschzählungen in den verschiedenen Zellkerngrößenbereichen. Aufgrund dieser Daten wurde für die automatische Erkennung das analytische Fenster auf eine Zellkerngröße von 7-14µm eingestellt. In diesem analysierten Fenster lag das günstigste Verhältnis zwischen Anzahl und korrekt gezählter Zellkerne vor. Im Mittel werden bei dieser Analysemethode ca. 1% Objekte falsch als Zellkerne definiert.

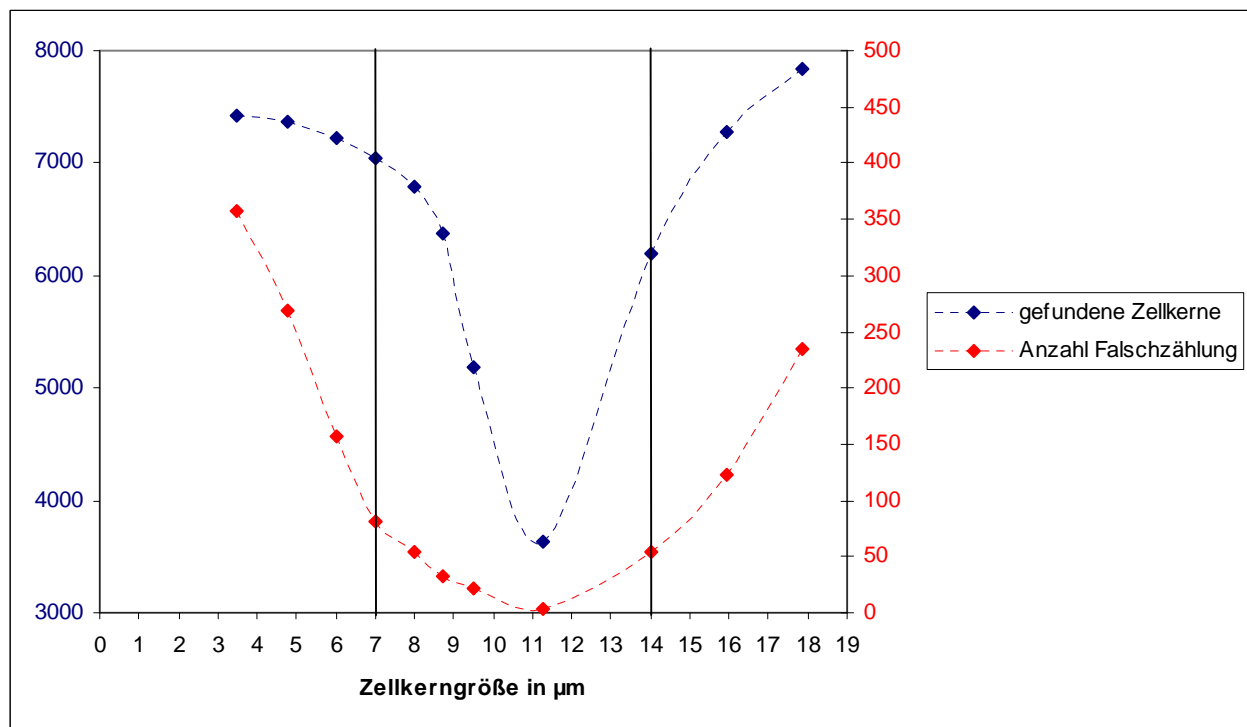


Abbildung 2: Darstellung des analytischen Fensters der zulässigen Zellkerngröße für die automatische Zellkernerfassung. Häufigkeit der gefundenen Zellkerne (blaue Reihe) und Falschzählungen (rote Reihe) in Bezug auf die zugelassene Zellkerngröße. Günstigstes analytisches Fenster zwischen 7-14µm Kerndurchmesser.

Im nächsten Schritt wurde das optimale Hintergrund-Objekt-Verhältnis für die Erfassung der Zellkerne ermittelt. Es wird als Anteil des maximalen (gesättigten) Blauwertes der DAPI-Gegenfärbung der Zellkerne angegeben. Zur Optimierung wurden die Suchergebnisse und die Falschzahlungen bei Schwellenwerten von 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% und 40% betrachtet. Die Anzahl der gefundenen Zellkerne stieg bei Schwellenwerten von 10% (5345), 20% (7250) und 25% (7262) an, um dann ab 30% (7262) wieder abzufallen (40%, 5465). Der Fehleranteil betrug bei einem 10%igen Schwellenwert 14,9%, fiel auf ein Minimum von 5,7% ab und stieg dann wieder an. Abbildung 3 veranschaulicht, dass das günstigste Verhältnis zwischen dem Anteil der gefundenen und der korrekt gezählten Zellkerne bei einem Schwellenwert von 30% liegt. Die blaue Reihe in Abbildung 3 zeigt den Verlauf der gefundenen Zellkerne und die rote Reihe den entsprechenden Fehleranteil.

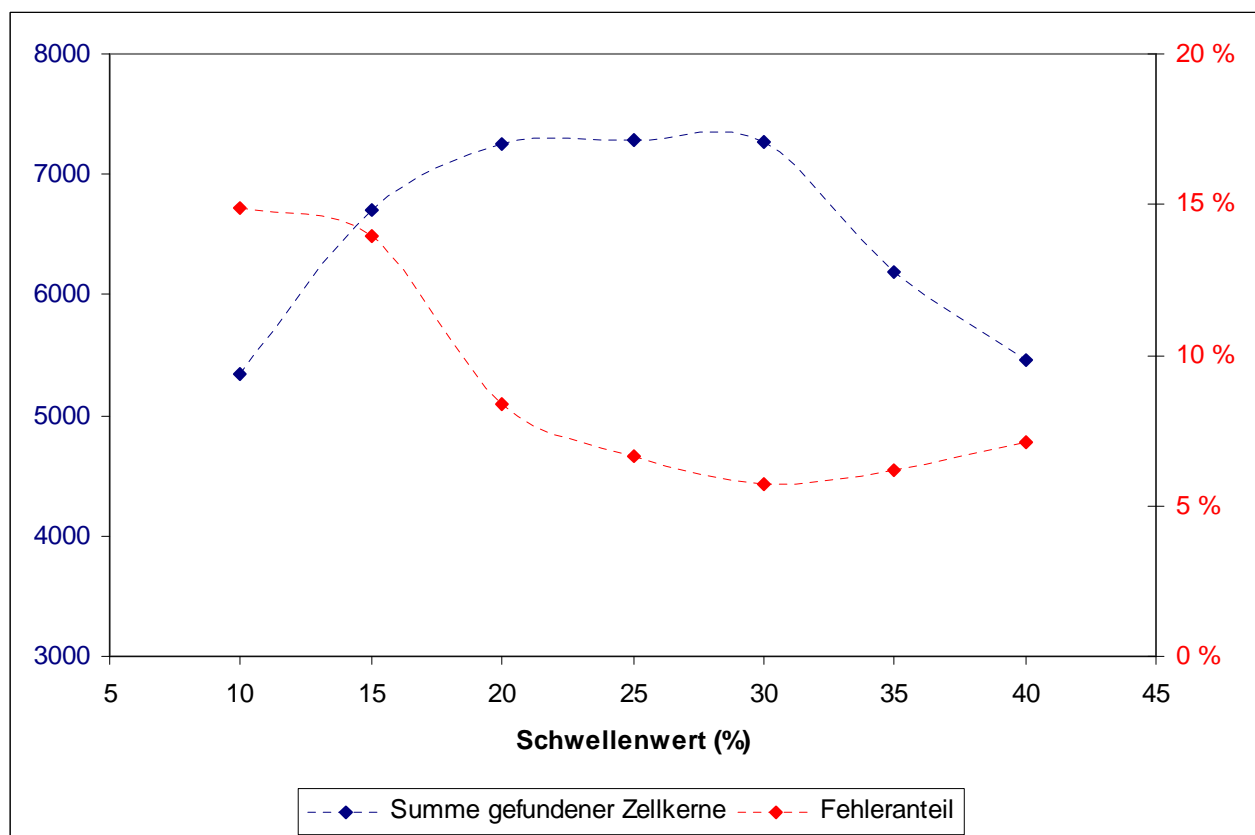


Abbildung 3: Darstellung des optimalen Hintergrund-Objekt-Verhältnisses. Häufigkeit der gefundenen Zellkerne (blaue Reihe) und der entsprechende prozentuale Fehler (rote Reihe) in Bezug auf verschiedene Hintergrund-Objekt-Verhältnisse (Schwellenwert). Optimales Hintergrund-Objekt-Verhältnis liegt bei 30%.

6.1.3 Beschleunigte Zellkernerfassung

Mit den für die manuelle Analyse ausgelegten Zellkernpräparaten beträgt die automatisierte Zählung von 3000 Zellkernen ungefähr 2,5 Stunden. Metafer erfasst die Kernzahl pro Bildfeld, das heißt, je mehr Zellkerne in einem Bildfeld sind, umso mehr Kerne werden gleichzeitig erfasst. Mit dem Ziel, die Auswertungszeit zu verkürzen, wurde für die maschinelle Analyse die Zellkerndichte auf dem Objektträger erhöht. Bei 450.000-500.000 Zellkernen/cm² wurde ein Optimum erreicht. Dadurch konnten 1000 Zellkerne in 20-30 Minuten erfasst werden. Bei Zelldichten über diesem Wert konnte die Cytosoft-Bildanalyse die Zellkerne nicht mehr als einzelne Objekte erkennen. Abbildung 4 zeigt ein Bild der mikroskopischen Kontrolle mit der anzustrebenden Zelldichte von ca. 450.000 Zellkernen/cm².

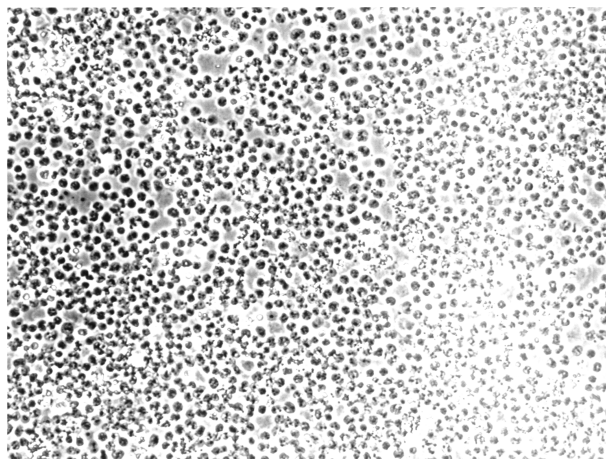


Abbildung 4: Mikroskopische Phasenkontrastaufnahme bei 100-facher Vergrößerung zeigt die Zelldichte auf dem Objektträger bei ca. 450.000 Zellkernen/cm² für die maschinelle Auswertung.

Eine weitere Beschleunigung der Analyse wurde dadurch erreicht, dass anstatt eines Objektives mit 40-facher Vergrößerung eines mit 20-facher Vergrößerung gewählt wurde. Dadurch werden der Abbildungsmaßstab verkleinert und mehr Zellkerne pro Bild erfasst. Ein Vergleich der Daten der Zellzählung mit beiden Objektiven ergab etwa die gleiche Summe erkannter Zellen. So wurden bei Patient 42 3011 Kerne mit dem 20er Objektiv und 2976 Kerne mit dem 40er Objektiv gezählt. Es wurde darauf geachtet, dass das Suchfenster identisch ist. Die Analysezeit verkürzte sich von 168 Minuten

(40er Objektiv) auf 67 Minuten (20er Objektiv), also um 60%. Neben der korrekten Zellzählerfassung galt es auch zu prüfen, ob die FISH-Signale der Chimärismusanalyse (siehe Kapitel 5.6) richtig gezählt wurden. Für diese Beurteilung wurde genutzt, dass nach FISH unterschiedliche Zellpopulationen entsprechend ihres Signalmusters unterschieden werden. Die Verteilung der Zellen in dieser Population ist nicht zuletzt direkt auf die Qualität der Bildanalyse zurückzuführen. Mit beiden Objektiven erhielt man für die unterschiedlichen Zellpopulationen der Patientenprobe ähnliche Werte (siehe Abbildung 5). Die Werte zeigten eine maximale Abweichung von <7% in den 3 Hauptpopulationen XY, XO, XYY. Dies bedeutet, dass die beschleunigte Zellanalyse zur gleichen Datenlage führt wie eine Analyse mit einem 40er-Objektiv.

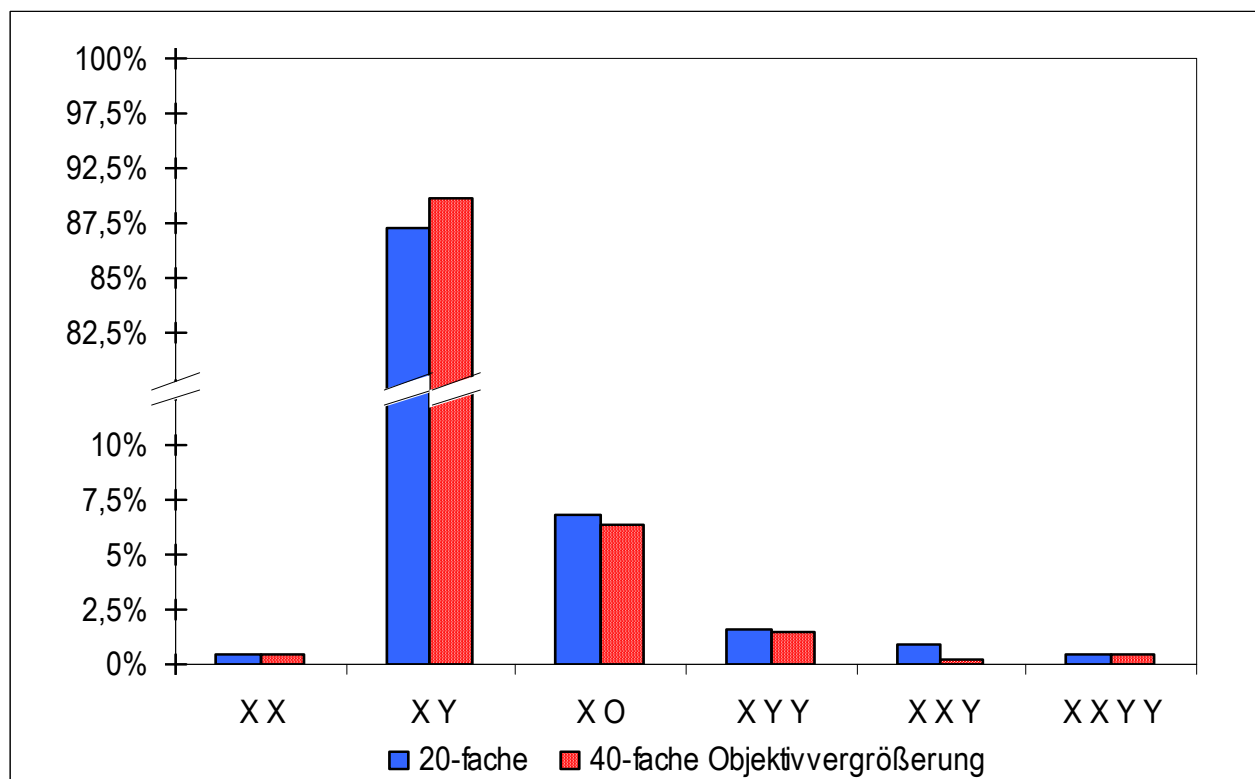


Abbildung 5: Vergleichende Betrachtung der Zellerfassung mit Objektiven mit einer 20-fachen (blaue Säulen) und 40-fachen (rote Säulen) Vergrößerung. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Zellen aus den verschiedenen Populationen XX, XY, XO, XYY, XXY und XXYY.

6.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen

6.2.1 Nachweisgrenze für XX- und XY-Zellen

Der FISH-Nachweis von rezipienten Zellen nach gegengeschlechtlicher Transplantation beruht auf der Darstellung der Zentromere des X- und Y-Chromosoms. Da, methodisch bedingt, nicht jedes FISH-Signal auch mit Sicherheit von dem entsprechenden Zentromer stammt (z.B. aufgrund von unspezifischen fluoreszierenden Partikeln) und, bedingt durch die automatisierte Zellkernerfassung, wie zuvor beschrieben ein Fehler zugelassen werden musste, war es erforderlich, die Nachweisgrenze (cut off) zu ermitteln, ab dem eine bestimmte FISH-Signalkombination darauf schließen lässt, dass eine Zelle mit dem entsprechenden Geschlecht tatsächlich vorliegt.

Um die Anzahl der möglichen falsch eingestuften positiven Zellen in der Chimärismusanalyse eines weiblichen oder eines männlichen Patienten zu ermitteln, wurden in Blutproben von 10 gesunden weiblichen Probanden, bei denen nachgewiesenermaßen keine Schwangerschaft mit einem männlichen Kind vorgelegen hat, und von 11 gesunden männlichen Probanden nach Zellen mit einer gegengeschlechtlichen FISH-Signalkonstellation gefahndet. Bei den weiblichen Probanden kamen insgesamt 26633 Zellkerne zur Auswertung, bei den männlichen Probanden wurden 35783 Zellkerne beurteilt. Die Hybridisierung und Zellzählung erfolgte, wie in Kapitel 5 beschrieben, mit dem Bildanalysesystem MetaCyte der Firma MetaSystems. Bei den weiblichen Probanden wurden 257 XY- unter 26633 Zellkernen gefunden, bei den männlichen Probanden waren es 142 XX- unter 35783 Zellkernen. Das ergibt einen Fehler von 0,97% für falsch positiv eingestufte männliche bzw. 0,4% für falsch positiv eingestufte weibliche Zellkerne.

Um die maschinelle Zählung zu kontrollieren, wurden alle 257 XY-Zellkerne und alle 142 XX-Zellkerne überprüft. Die visuelle Kontrolle ergab, dass 38 der 257 XY-Zellkerne eine für das männliche Geschlecht typische Signalkonstellation von einem roten und einem grünen Signal aufwiesen, während die übrigen Zellkerne eine XX-Markierung hatten, und dass 27 der 142 eine für das weibliche Geschlecht typische Markierung mit zwei roten Signalen zeigten, während die übrigen Zellkerne eine XY-Markierung

aufwiesen. Das ergibt einen Fehler von 0,14% für falsch positiv eingestufte männliche bzw. negativ weibliche Zellkerne und von 0,08% für falsch eingestufte positiv weibliche bzw. negativ männliche Zellkerne.

Stichprobenartig wurden auch 4841 weibliche Zellkerne bei den weiblichen Probanden – und 4535 Zellkerne bei der männlichen Probandengruppe visuell überprüft. Diese Kontrolle ergab keine Falschzählung. Daraus kann geschlossen werden, dass in der Gruppe der XX-Zellen weiblicher Probanden und der Gruppe der XY-Zellen männlicher Probanden die automatische Zellzählung mit den unter 5.6 und 6.1 beschriebenen Parametern zu keiner Falschzählung führt. Demgegenüber konnte der Fehler von 0,97% für falsch positiv eingestufte männliche Zellen und der Fehler von 0,4% für falsch positiv eingestufte weibliche Zellen auf 0,14% bzw. 0,08% reduziert werden. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der Auswertung der beiden Probandengruppen.

Tabelle 8: Darstellung des systemischen und methodischen Fehlers bei der maschinellen Erfassung von weiblichen und männlichen Zellen bei Kontrollprobanden und Fehlerreduktion durch visuelle Kontrolle

Probanden	ausgewertete Zellkerne	männl./weibl. Zellkerne nach maschineller Zählung	Gesamtfehler (systemisch und methodisch)	männl./weibl. Zellkerne nach visueller Kontrolle	methodischer Fehler nach visueller Kontrolle
weiblich	26633	257*	0,97 %	38*	0,14 %
männlich	35783	142	0,40 %	27	0,08 %

6.2.2 Die Abhängigkeit der Nachweisgrenze von der Stichprobengröße

Die Nachweisgrenze für rezipiente Zellen ist von der Stichprobengröße abhängig. Um die Nachweisgrenze bei unterschiedlicher Zahl analysierter Zellen zu ermitteln, wurden die Zahlenwerte der weiblichen und männlichen Kontrollproben nach Excel-Zufallsverteilung beliebig sortiert und in 50er, 100er, 200er, 400er, 800er, 1500er, 2000er, 2500er, 3000er und 4000er Blöcke zusammengefasst. Dann wurden der Mittelwert und die Standardabweichung innerhalb des jeweiligen Blockes ermittelt. Damit konnte die Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der Stichprobengröße errechnet werden. Die Nachweisgrenze wurde definiert als Mittelwert plus *doppelte* Standardabweichung. Da die Nachweisgrenze nur für die jeweiligen Blöcke ermittelt wurde, für die Praxis aber für alle Werte kontinuierlich eine Aussage getroffen werden sollte, wurde mit einer Trendkurve eine annähernde Bestimmung durchgeführt. Die Nachweisgrenze innerhalb der Zahlenblöcke ist in Abbildung 6 in Abhängigkeit zu der gezählten Zellkernzahl graphisch für beide Probandengruppen dargestellt.

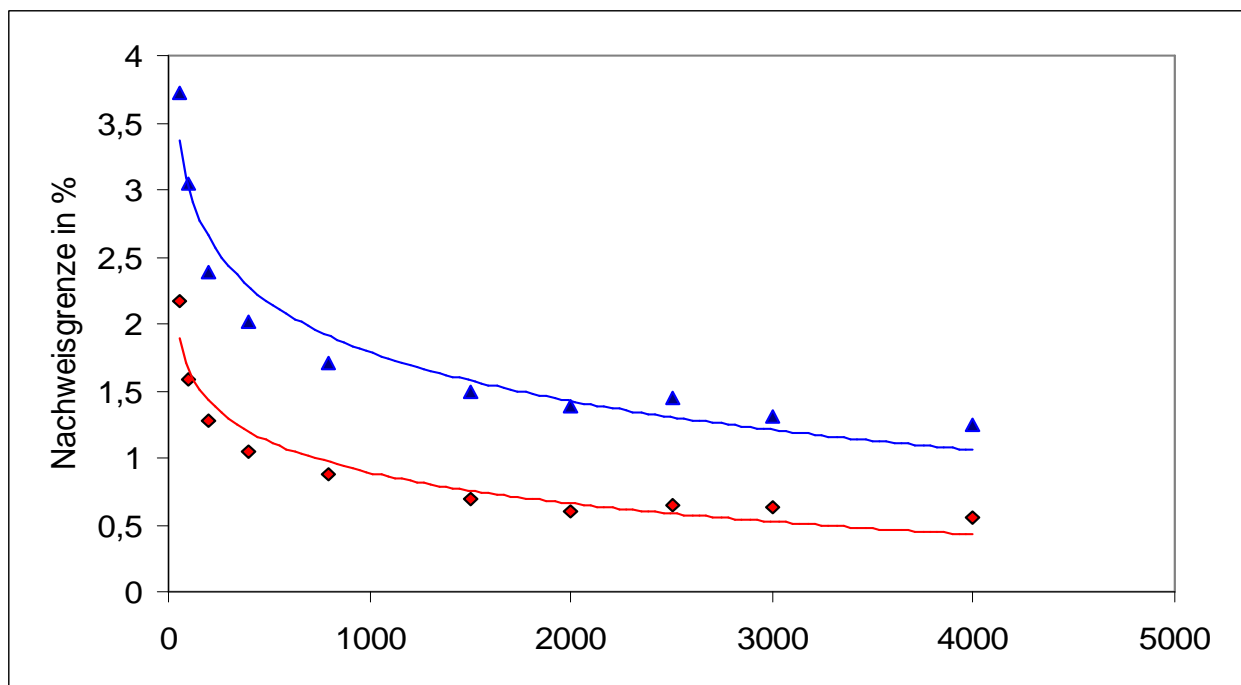


Abbildung 6: Darstellung der Nachweisgrenze (%) in Abhängigkeit von der gezählten Zellzahl weiblicher (rote Kurve) und männlicher (blaue Kurve) rezipienter Zellen.

6.2.3 Die Fehlerrate für falsch eingestufte positive und negative Zellen mit Trisomie 8

Zur Ermittlung des Schwellenwertes für falsch eingestufte positive Zellkerne mit einer Trisomie 8 wurde unter 15882 Zellen von fünf gesunden Probanden mit einer Zentromer 8-FISH-Sonde der Anteil der Zellkerne mit einer Trisomie 8-spezifischen Signalkonstellation ermittelt. Auch der Fehler der falsch eingestufte negativen Trisomie-8-Zellkerne sollte ermittelt werden. Da hierfür allerdings keine Zelllinie zur Verfügung stand, die garantiert nur aus Trisomie-8-Zellen besteht, wurde der methodische Fehler für einen Signalverlust durch den Anteil der vermutlichen Monosomie-8-Zellen herangezogen. Ausgehend davon, dass theoretisch bei 100% der untersuchten Zellen eine Disomie 8 vorliegt, wurden alle dann abweichenden Werte als Messfehler interpretiert. Die Messfehler ergaben die Nachweisgrenzen für Zellen mit einer Monosomie oder Trisomie 8 (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl bzw. Anteil an Trisomie 8 falsch positiven und falsch negativen Zellen in Proben von 5 Kontrollprobanden

Proband Nr.	ausgewertete Zellen	Anzahl Signalkonstellation			Anteil Signalkonstellation	
		1	2	3	1	3
1	2815	370	2427	18	13,14 %	0,74 %
2	3942	1173	2728	41	29,76 %	1,50 %
3	2899	781	2083	35	26,94 %	1,68 %
4	2226	431	1772	23	19,36 %	1,30 %
5	4000	666	3302	32	16,65 %	0,97 %
Summe	15882	3421	12312	149	Mittelwert	
					21,54 %	1,21 %

Zellen mit Signalkonstellation 1 repräsentieren Monosomie 8-Zellen (entspricht der Anzahl falsch negativer Zellen), Zellen mit Signalkonstellation 2 repräsentieren Disomie 8-Zellen und Zellen mit Signalkonstellation 3 repräsentieren Trisomie 8-Zellen (entspricht der Anzahl falsch positiver Zellen).

Im Mittel wurde in 77,3% eine Disomie 8, in 1,2% eine Trisomie 8 und in 21,5% eine Monosomie 8 gefunden.

6.2.4 Nachweisgrenze für rezipiente Zellen mit Trisomie 8

Bei Patienten mit einem Tumormarker besteht nach gegengeschlechtlicher Transplantation die Möglichkeit, mit FISH-Sonden sowohl das Geschlecht als auch den Tumormarker in jeder Zelle zu identifizieren. Diese kombinierte FISH-Analyse sollte tumormarkertragende und nicht tumormarkertragende rezipiente Zellen unterscheiden lassen.

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze für eine Zelle mit beiden Markern, Tumormarker und Empfängergeschlecht, müsste bei gesunden Probanden nach gegengeschlechtlichen Zellen mit Tumormarker gefahndet werden. Da diese sehr unwahrscheinlich sind, wurde eine Abschätzung der Nachweisgrenze mittels Quantilen durchgeführt. Dabei wurde eine 95%ige Sicherheit zugrunde gelegt, also das Quantil₉₅ mittels Excel interpoliert. Es beschreibt den Wert eines Punktes einer Verteilung, unterhalb dessen sich 95% aller Fälle der Verteilung befinden.

Die Formel zur Berechnung ist:

$$x_{j+1} + g \cdot (x_{j+2} - x_{j+1})$$

mit: j als ganzzahligen Anteil von $(N - 1) \cdot p$ und g der gebrochene Anteil
 $p=0,95$

Das 95er-Quantil für falsch eingestufte männliche Zellkerne beträgt 0,3127%, das für falsch eingestufte weibliche Zellkerne 0,1782% und das für falsch eingestufte Trisomie 8-positive Zellkerne 1,6448%. Daraus können die jeweiligen Fehlerwahrscheinlichkeiten (F) bestimmt werden, die für falsch eingestufte männliche Zellkerne 0,003127%, für falsch eingestufte weibliche Zellkerne 0,001782% und für falsch eingestufte Trisomie 8-positive Zellkerne 0,016448% betragen. Durch Multiplikation der Fehlerwahrscheinlichkeiten bekommt man die entsprechenden Nachweisgrenzen bei der kombinierten Hybridisierung mit X- und Y-FISH-Sonden und Tumormarkersonde Trisomie 8. Das heißt, die Nachweisgrenze für weibliche Rezipientenzellen mit Trisomie

8 entspricht dem Wert, der durch Multiplikation von falsch eingestuften positiven männlichen und falsch eingestuften Trisomie 8-positiven Zellkernen errechnet wird, und beträgt 0,005%; die Nachweisgrenze analog für männliche Rezipientenzellen mit Trisomie 8 entspricht dem Wert, der durch Multiplikation von falsch eingestuften positiven weiblichen und falsch eingestuften Trisomie 8-positiven Zellkernen errechnet wird, und beträgt 0,003%. In Tabelle 10 sind die jeweiligen Quantile und Fehlerwahrscheinlichkeiten dargestellt.

Tabelle 10: Abschätzung der Nachweisgrenze für die kombinierte Hybridisierung (von Gonosomen-DNA und Tumormarker Trisomie 8) für weibliche und männliche Patienten mittels 95er-Quantil

Patient				positiv Trisomie 8		Nachweisgrenze bei kombinierter Hybridisierung
				Quantil _{0,95}	F	
				1,6448 %	0,01644	
♀	falsch männlich	Quantil _{0,95} F	0,3127 % 0,003127	0,00005		0,005 %
♂	falsch weiblich	Quantil _{0,95} F	0,1782 % 0,001728	0,00003		0,003 %

Nach Errechnung des 95er-Quantils und Bestimmung der Fehlerwahrscheinlichkeiten für falsch eingestufte positiv männliche, falsch eingestufte positiv weibliche und falsch eingestufte Trisomie 8-positive Zellkerne lässt sich durch Multiplizieren der jeweiligen Fehlerwahrscheinlichkeiten (F) die Nachweisgrenze der entsprechenden Kombination (weiblich/männlich und Trisomie 8) bestimmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der simultanen Hybridisierung von X-, Y- und Trisomie 8-FISH-Sonden eine tumormarker-positiv rezipiente Zelle unter 20.000 Spenderzellen als Tumorzelle angesprochen werden kann.

6.2.5 Die Fehlerrate für falsch eingestufte positive und negative Zellen mit BCR/ABL-Genfusion

Die zweite Patientengruppe in dieser Arbeit wies als Tumormarker eine BCR/ABL-Genfusion auf, die gewöhnlich aus der Chromosomentranslokation t(9;22)(q34;q22) resultiert. Zur Ermittlung des Schwellenwertes für falsch eingestufte positive Zellen mit einer BCR/ABL-Genfusion wurden 11453 Zellen von elf gesunden Probanden mit BCR und ABL-FISH-Sonden untersucht. Dabei waren insgesamt 11377 Zellen BCR/ABL negativ und 76 (0,66 %) wiesen eine BCR/ABL positive Signalkonstellation auf. Die Anzahl der BCR/ABL positiven Zellen in jeder der 11 Probanden ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Anteil BCR/ABL-positiver Zellen in Proben von 11 Kontrollprobanden (falsch-positiv Rate)

Proband Nr.	ausgewertete Zellen	Anzahl BCR/ABL negativ	Anzahl BCR/ABL positiv	%-Anteil BCR/ABL positiv
1	1022	1020	2	0,20 %
2	800	797	3	0,38 %
3	731	729	2	0,27 %
4	2949	2927	22	0,75 %
5	958	944	14	1,46 %
6	504	495	9	1,79 %
7	1261	1252	9	0,71 %
8	394	392	2	0,51 %
9	1323	1321	2	0,15 %
10	895	886	9	1,01 %
11	616	614	2	0,32 %
Summe	11453	11377	76	0,66 %

Zur Ermittlung des Schwellenwertes für falsch eingestufte negative Zellen mit einer BCR/ABL-Genfusion wurden 2710 Zellen der CML-Leukämiezellreihe KCL-22 untersucht, die ausschließlich aus BCR/ABL positiven Zellen besteht. Davon erwiesen sich 2679 Zellen als BCR/ABL positiv und 31(1%) BCR/ABL negativ. Von dieser

Modellzelllinie abgeleitet, ist bei 100% BCR/ABL positiver Zellen von einer Falschnegativrate von 1% auszugehen.

6.2.6 Nachweisgrenze für rezipiente Zellen mit BCR/ABL-Genfusion

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze für Tumorzellen, die sowohl das Empfängergeschlecht als auch den Tumormarker BCR/ABL tragen, wurde analog, wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben, verfahren, das heißt, es wurde mit Excel eine Abschätzung mittels Quantilen durchgeführt.

Das 95er-Quantil für falsch eingestufte männliche Zellkerne beträgt 0,3127%, das für falsch eingestufte weibliche Zellkerne 0,1782% und das für falsch BCR/ABL-positive Zellkerne 1,6244%. Daraus können die jeweiligen Fehlerwahrscheinlichkeiten (F) bestimmt werden, die für falsch eingestufte männliche Zellkerne 0,003127%, für falsch eingestufte weibliche Zellkerne 0,001782% und für falsch eingestufte BCR/ABL-positive Zellkerne 0,01624% betragen. Durch Multiplikation der Fehlerwahrscheinlichkeiten bekommt man die entsprechenden Nachweisgrenzen bei der kombinierten Hybridisierung mit X- und Y-FISH-Sonden und Tumormarkersonde BCR/ABL. Das heißt, die Nachweisgrenze für weibliche Rezipientenzellen mit BCR/ABL entspricht dem Wert, der durch Multiplikation von falsch eingestuften positiven männlichen und falsch eingestuften BCR/ABL-positiven Zellkerne errechnet wird, und beträgt 0,005%; die Nachweisgrenze analog für männliche Rezipientenzellen mit BCR/ABL entspricht dem Wert, der durch Multiplikation von falsch eingestufte positiven weiblichen Zellkernen und falsch eingestuften BCR/ABL-positiven Zellkernen errechnet wird, und beträgt 0,003%. In Tabelle 12 sind die jeweiligen Quantile und Fehlerwahrscheinlichkeiten dargestellt.

Tabelle 12: Abschätzung der Nachweisgrenze für die kombinierte Hybridisierung (von Gonosomen-DNA und Tumormarker BCR/ABL-Fusion) für weibliche und männliche Patienten mittels 95er-Quantil

Patient				BCR/ABL positiv		Nachweisgrenze bei kombinierter Hybridisierung
				Quantil _{0,95}	F	
				1,6235 %	0,01624	
♀	falsch männlich	Quantil _{0,95} F	0,3127 % 0,003127	0,00005		0,005 %
♂	falsch weiblich	Quantil _{0,95} F	0,1782 % 0,001728	0,00003		0,003 %

Nach Errechnung des 95er-Quantils und Bestimmung der Fehlerwahrscheinlichkeiten für falsch eingestufte positiv männliche, falsch eingestufte positiv weibliche und falsch eingestufte BCR/ABL-positive Zellkerne lässt sich durch Multiplizieren der jeweiligen Fehlerwahrscheinlichkeiten (F) die Nachweisgrenze der entsprechenden Kombination (weiblich/männlich und BCR/ABL-Fusion) bestimmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der simultanen Hybridisierung von X- , Y- und BCR/ABL-FISH-Sonden eine tumormarker-positiv rezipiente Zelle unter 20.000 Spenderzellen als Tumorzelle angesprochen werden kann.

6.3 Quantifizierung und Charakterisierung der rezipienten Zellen in Patientenproben nach Transplantation

6.3.1 Verteilung des Patientenkollektivs nach FISH-Chimärismusanalyse

Der Anteil der rezipienten Zellen nach Stammzelltransplantation ist ein wichtiges Kriterium, um den Therapieerfolg zu beurteilen und das weitere therapeutische Vorgehen festzulegen. Um herauszufinden, ab wann rezipiente Zellen als klinisch relevant betrachtet werden müssen, wurden im Rahmen dieser Arbeit 454 Proben von 58 Patienten nach gegengeschlechtlicher Transplantation in einer FISH-Analyse mit X- und Y-Sonden auf rezipiente Zellen untersucht. Die Nachweisgrenze für rezipiente Zellen wurde für jede Probe individuell, abhängig von der Gesamtzahl auswertbarer Zellen, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, bestimmt. Bei 33 Patienten (290 Proben) wurden im gesamten posttransplantären Verlauf (mediane Betrachtungszeit 15 Monate) keine rezipienten Zellen nachgewiesen. Bei den verbleibenden 25 Patienten (163 Verlaufsproben über einer medianen Betrachtungszeit von 19 Monaten) wurden in mindestens einer Probe im Verlauf rezipiente Zellen gefunden. Insgesamt wurden in 47 von 163 Proben rezipiente Zellen nachgewiesen. Die Tabelle 13 und 14 im Anhang zeigen die Ergebnisse der Chimärismusanalyse aller Patienten.

Um zu beurteilen, ob rezipiente Zellen zu einem geringen Anteil eine klinische Relevanz haben könnten, wurden in Analogie zur Zytologie, bei der ein hämatologisches Rezidiv ab >5% rezipienten Zellen vorliegt, Patienten mit <4% rezipienten Zellen und >4% rezipienten Zellen betrachtet. Von den 25 Patienten mit rezipienten Zellen hatten 13 einen Anteil an rezipienten Zellen von <4% und 12 einen Anteil an rezipienten Zellen von >4%. Abbildung 7 illustriert die Aufspaltung der Patienten in die genannten Gruppen.

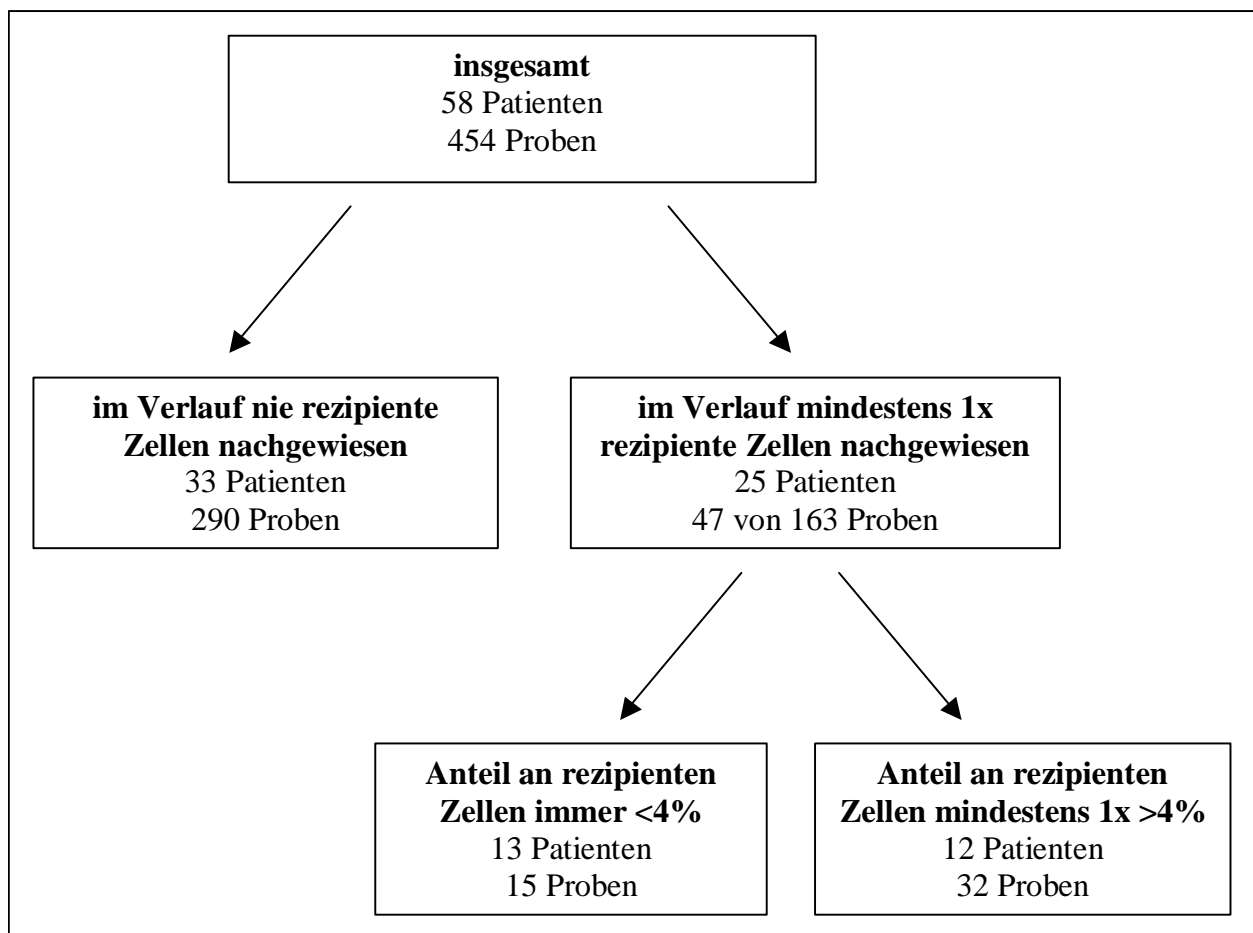


Abbildung 7: Aufteilung des Patientenkollektivs und der entsprechenden Proben nach der Chimärismusanalyse in Bezug auf den Anteil nachgewiesener Rezipientenzellen.

Betrachtet man das Transplantationsalter in den beiden Gruppen mit dem Auftreten von rezipienten Zellen <4% und >4%, so zeigt sich kein Unterschied. Das Transplantationsalter in der Gruppe <4% ist zwischen 10-55 Jahren (Median=46) und in der Gruppe >4% 0-66 Jahren (Median=49). Demnach gibt es keine Korrelation

zwischen dem Transplantationsalter und dem Auftreten von rezipienten Zellen $>4\%$ bzw. $>4\%$.

Bei der Betrachtung der beiden Gruppen im Hinblick auf die Art der Konditionierung (metakin oder klassisch) zeigt sich, dass in der Gruppe $<4\%$ rezipienter Zellen 7 (54%) Patienten klassisch und 5 (38%) Patienten metakin konditioniert wurden. Bei einem (7%) Patienten ist die Konditionierungsart nicht bekannt. In der Gruppe $>4\%$ rezipienter Zellen sind 3 (25%) Patienten klassisch und 8 (67%) Patienten metakin konditioniert. Bei einem (8%) Patienten ist die Konditionierungsart nicht bekannt.

Die Art der Konditionierung beeinflusst demnach das Auftreten von rezipienten Zellen, wobei bei der schonenden (metakinen) Konditionierung eher rezipiente Zellen $>4\%$ auftreten können. Patienten, die klassisch konditioniert wurden, haben eher rezipiente Zellen $<4\%$.

Eine Gegenüberstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der 33 Patienten ohne rezipiente Zellen, der 13 Patienten mit rezipienten Zellen $<4\%$ und der 12 Patienten mit rezipienten Zellen $>4\%$ ergibt folgendes Ergebnis: In der Gruppe ohne rezipiente Zellen verstarben 6 (18%) der Patienten. Alle verstarben innerhalb der ersten 13 Monate posttransplantär bei einem Betrachtungszeitraum zwischen 1-84 Monaten (Median=15). Todesursachen waren eine Infektion ($n=2$), ein Rezidiv ($n=1$), eine GvHD ($n=1$) und unbekannt ($n=2$).

Aus der Gruppe der Patienten mit rezipienten Zellen $<4\%$ verstarben 5 (38,5%) der Patienten. Der Anteil rezipienter Zellen lag hier zwischen 0,1-3,5%. Die Patienten verstarben zwischen dem 6. und 32. Monat posttransplantär. Der Betrachtungszeitraum betrug 6-48 Monate (median=19). Die Todesursachen waren eine Infektion ($n=2$), eine GvHD ($n=1$), ein fragwürdiges Rezidiv ($n=1$) und unbekannt ($n=1$).

Aus der Patientengruppe mit rezipienten Zellen $>4\%$ verstarben 8 von 12 (66,7%) Patienten. Der Anteil rezipienter Zellen lag in allen Proben dieser Patienten zwischen 0,2-96,6%. Der Betrachtungszeitraum betrug zwischen 4 und 33 Monate. Der Todeszeitpunkt lag zwischen dem 4. und 23. Monat. Sieben der 8 Patienten verstarben an einem Rezidiv. In einem der 8 Todesfälle war die Ursache eine Infektion (Patient 55). Die mediane Zeit zwischen erstem Auftreten von rezipienten Zellen und Rezidiv lag bei 6 Monaten.

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 8 stellt die Verläufe der 3 Patientengruppen graphisch zusammen.

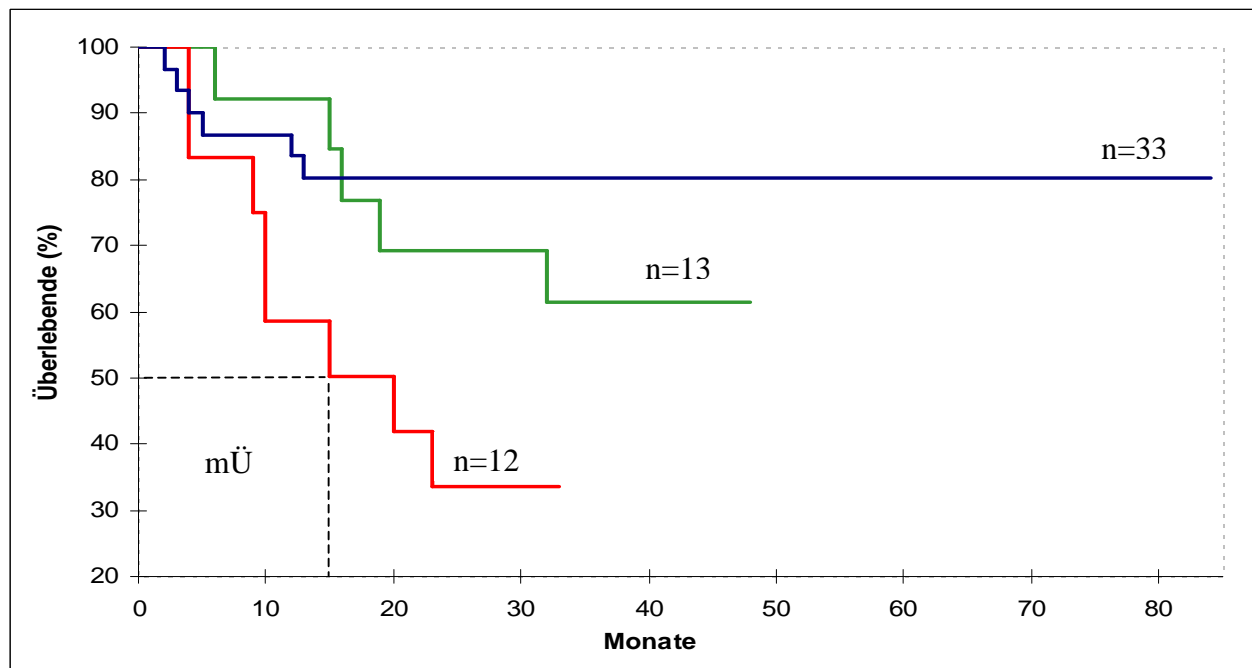


Abbildung 8: Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier von 33 Patienten ohne rezipiente Zellen (blaue Kurve), 13 Patienten < 4% rezipienten Zellen (grüne Kurve) und 12 Patienten > 4% rezipienten Zellen (rote Kurve) im posttransplantären Verlauf. Mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit (mÜ).

Patienten ohne nachweisbare rezipiente Zellen zeigten eine mediane Überlebenswahrscheinlichkeit von ≥ 25 Monaten. Patienten mit >4% rezipienten Zellen wiesen ein medianes Überleben von 15 Monaten auf, und 34% erreichten eine Überlebenszeit von 30 Monaten posttransplantär. Patienten mit <4% rezipienten Zellen zeigen einen intermediären Verlauf, das heißt 70% erreichten eine Überlebenszeit von 30 Monaten. Daraus kann geschlossen werden, dass der Nachweis von einer Probe mit rezipienten Zellen $\geq 4\%$ für die Prognose ungünstig ist.

Eine Betrachtung des Zeitpunktes des Auftretens von rezipienten Zellen posttransplantär zeigt, dass 38 (81%) der insgesamt 47 Proben mit rezipienten Zellen von den ersten 12 Monaten nach Transplantation stammen und nur 9 (19%) von Zeitpunkten danach. Patientenproben mit <4% rezipienten Zellen werden zu 80%, solche mit >4% rezipienten Zellen zu 44% in den ersten 12 Monaten gefunden. Daraus kann geschlossen werden, dass rezipiente Zellen <4% verstärkt in den ersten 12 Monaten nach Transplantation auftreten. Für rezipiente Zellen >4% kann diese Aussage nicht getroffen werden. Abbildung 9 zeigt die zeitliche Verteilung von Proben

mit rezipienten Zellen in Abhängigkeit der Gesamtzahl entnommener Proben des entsprechenden Monats.

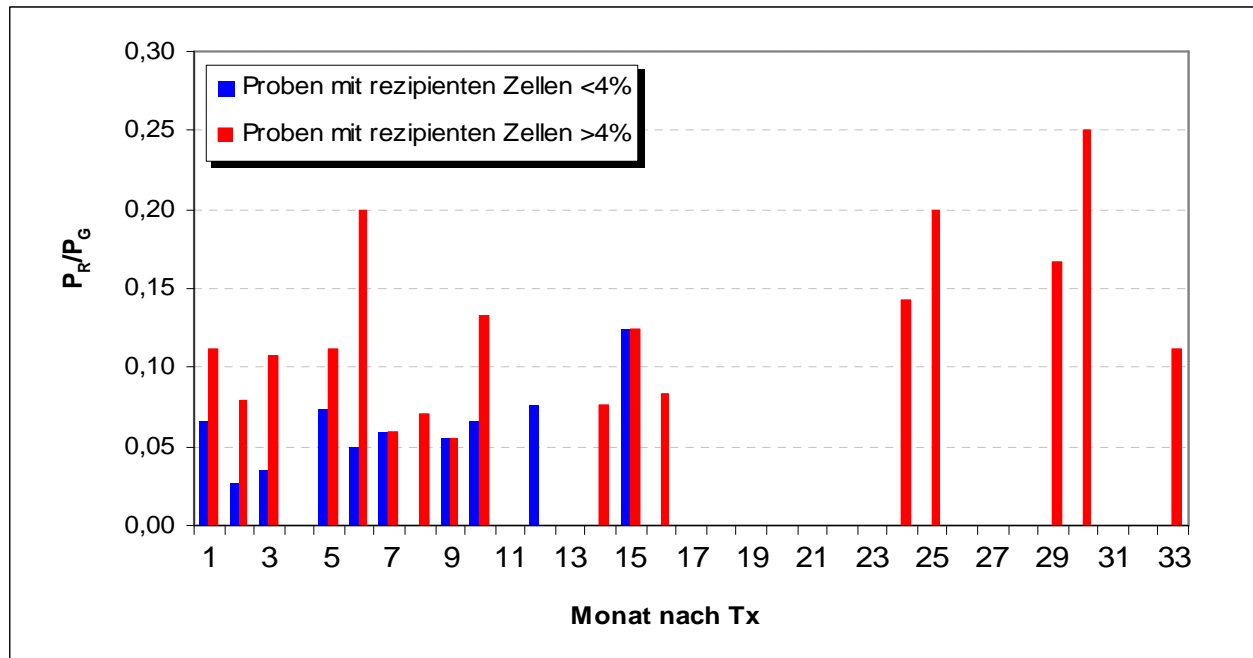


Abbildung 9: Darstellung des posttransplantären Auftretens von Proben mit rezipienten Zellen >4% und <4%, P_R/P_G beschreibt den Anteil der Proben mit rezipienten Zellen abhängig von der Gesamtzahl der Proben im entsprechenden Monat.

6.3.2 Rezipiente Zellen mit und ohne Tumormarker

Bei dem hier untersuchten Patientengut konnte bei 12 Patienten prätransplantär ein zytogenetischer Tumormarker nachgewiesen werden. 9 Patienten hatten den Tumormarker BCR/ABL und 3 Patienten eine Trisomie 8. Aus diesem Grund wurde mit den Verlaufspuben eine Simultanhybridisierung mit X- und Y-FISH-Sonden und BCR/ABL- bzw. Zentromer 8-FISH-Sonden durchgeführt mit dem Ziel, die Nachweisgrenze für rezipiente Zellen zu senken (siehe Kapitel 6.2.1 und 6.2.6) und eindeutig Tumorzellen zu identifizieren. Die Auswertung erfolgte, wie in Kapitel 5.7 und 5.8 beschrieben.

Auf diese Weise konnten von den genannten 12 Patienten 55 posttransplantäre Verlaufspuben untersucht werden. Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Patienten mit bekanntem Tumormarker und Proben in Bezug auf rezipiente Zellen.

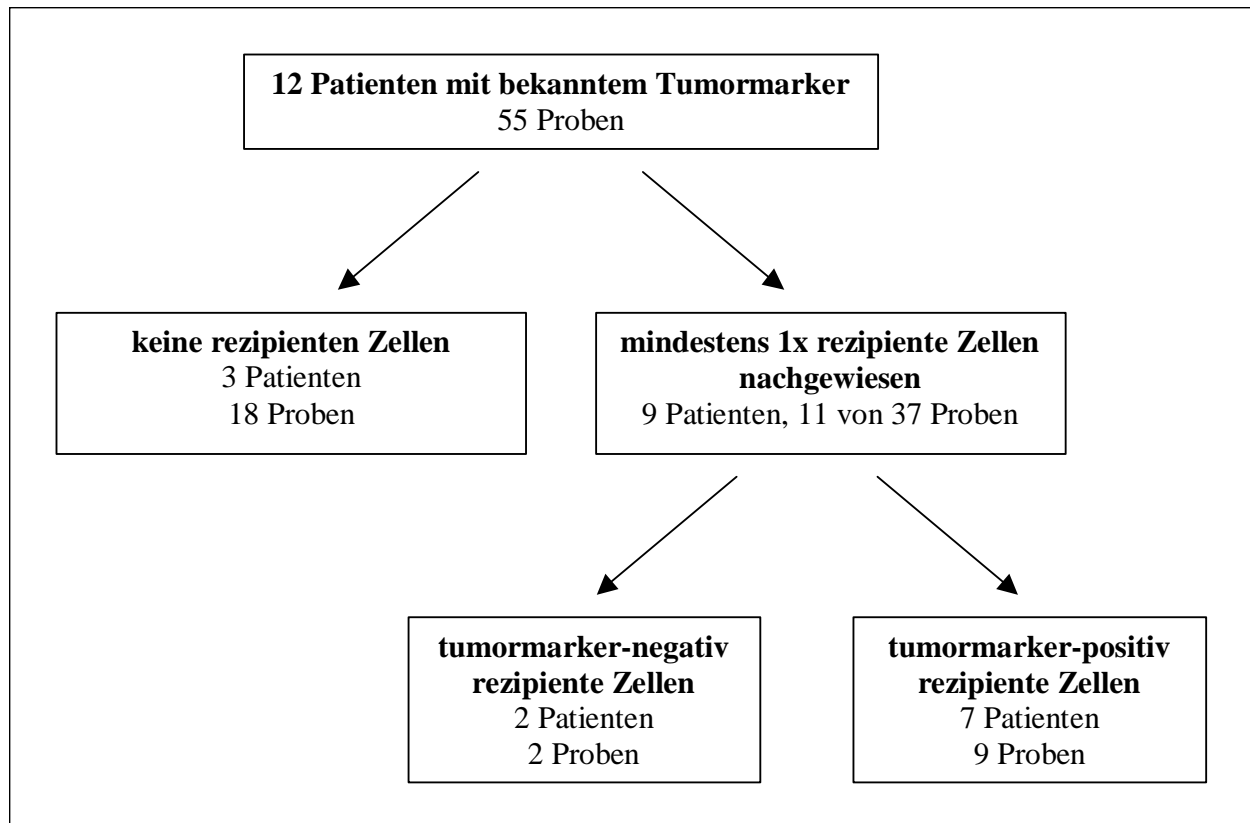


Abbildung 10: Aufteilung der 12 Patienten und der entsprechenden Proben mit bekanntem Tumormarker in Bezug auf nachgewiesene tumormarker-positive und -negative Rezipientenzellen.

Bei 9 der 12 Patienten wurden in insgesamt 11 Proben rezipiente Zellen zwischen 0,1-3,3% gefunden. Bei 2 der 9 Patienten (4, 15) konnten keine Tumormarker in den rezipienten Zellen gefunden werden, während 7 Patienten (30, 32, 37, 38, 39, 43, 48) tumormarker-positiv rezipiente Zellen hatten. Zusammengefasst wurde in 3 Proben ausschließlich tumormarker-negativ rezipiente Zellen gefunden, während in 8 Proben tumormarker-positiv rezipiente Zellen (insgesamt 25) vorlagen. Der Nachweis eines Tumormarkers identifiziert eine rezipiente Zelle eindeutig als Tumorzelle. Bei rezipienten Zellen ohne Tumormarker ist diese Schlussfolgerung nicht eindeutig.

6.3.3 Tumormarker-negativ rezipiente Zellen und klinischer Verlauf

Um einen Hinweis auf die klinische Bedeutung von tumormarker-negativ rezipienten Zellen zu erhalten, wurden die Verläufe der Patienten 4 und 15 betrachtet. Bei beiden Patienten wurde jeweils eine Probe mit tumormarker-negativ rezipienten Zellen

gefunden. Bei Patient 4 konnten im Monat 5 nach Transplantation 2,8% rezipiente Zellen ohne den bekannten Tumormarker BCR/ABL gefunden werden. Abbildung 11 zeigt eine dieser tumormarker-negativen rezipienten Zellen. Der Patient verstarb im Monat 19 an einer GvHD (siehe Tabelle 15).



Abbildung 11: BCR/ABL negativer weiblicher Zellkern (rezipiente Zelle) von Patient 4. Die blauen Signale markieren das X-Zentromer, die grünen Signale markieren das BCR-Allel und die roten das ABL-Allel.

Bei Patient 15 wurden im Monat 12 3,3% Residualzellen ohne Tumormarker gefunden (keine Abbildung). Der Betrachtungszeitraum betrug 33 Monate. Insgesamt wurden von Patient 15 8 von 17 Proben simultan hybridisiert und nur in der einen beschriebenen Probe rezipiente Zellen gefunden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Posttransplantärer Verlauf der Patienten mit tumormarker-negativen rezipienten Zellen

Patienten Nr.	Monate nach Tx	1	2	3	4	5	9	12	13	14	16	17	19	20	21	24	29	33
(4)		U ^{3,0%}				2,8 %							+					
(15)		U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{2,3%}	3,3 %	U ^{2,2%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}

Blau markiert sind simultan mit X- und Y-FISH-Sonden und BCR/ABL- bzw. Zentromer 8-FISH-Sonden hybridisierte Proben, Prozentwerte in blau kennzeichnen den Anteil tumormarker-negativer rezipienter Zellen. Bei Proben, die mit U^{x%} markiert sind, ist der Anteil rezipienter Zellen unter der Nachweisgrenze von x%; mit „+“ ist der Todeszeitpunkt markiert.

Fazit: Der Nachweis von 2,8% bzw. 3,3% tumormarker-negativ rezipienten Zellen im Monat 5 bzw. 12 bei zwei Patienten ist ohne erkennbare Verbindung mit einem klinischen Ereignis.

6.3.4 Tumormarker-positiv rezipiente Zellen und klinischer Verlauf

Im Weiteren wurden die klinischen Verläufe der 7 Patienten mit tumormarker-positiv rezipienten Zellen betrachtet, um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von tumormarker-positiv rezipienten Zellen und klinischen Ereignissen erkannt werden kann. Bei 3 der 7 Patienten wurden in jeweils einer Probe tumormarker-positiv rezipiente Zellen nachgewiesen. Die Grunderkrankung war bei 2 Patienten eine CML und bei einem Patienten eine AML. Der Nachweis residualer Tumorzellen ist für Fall 32 exemplarisch in Abbildung 12 dargestellt. Die Anteile rezipienter Zellen schwankten bei den Patienten zwischen 0,2-0,3% (siehe Tabelle 16). Patient 32 und 48 hatten tumormarker-positiv rezipiente Zellen im 3. Monat nach Transplantation (2 Zellen (0,2%) bzw. 3 Zellen (0,3%)) und Patient 37 im 1. Monat (3 Zellen (0,3%)) nach Transplantation. Patient 37 verstarb in Monat 10 an einem Rezidiv. Der Betrachtungszeitraum der Patienten 32 und 48 betrug 24 bzw. 16 Monate. Tabelle 16 zeigt den Verlauf der 3 Patienten aus dieser Gruppe.

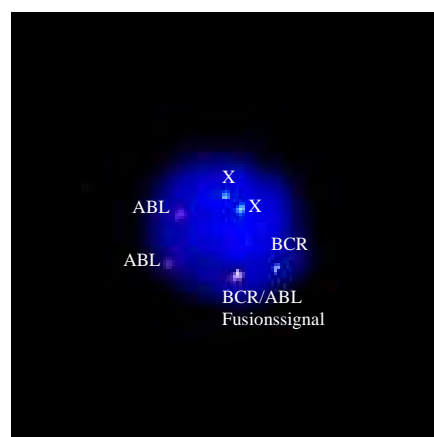


Abbildung 12: Weiblicher tumormarker-positiver Zellkern (rezipiente Zelle) von Patient 32. Es sind die X-Chromosomen sowie das BCR/ABL Fusionssignal zu sehen.

Tabelle 16: Posttransplantärer Verlauf der Patienten mit tumormarker-positiv rezipienten Zellen

Patienten Nr.	Monate 1	nach 2	Tx 3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	19	20	24
(32)	U ^{2,4%}	U ^{1,7%}	0,2 %		U ^{2,1%}	U ^{2,6%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{2,1%}		U ^{2,2%}	U ^{1,7%}	U ^{2,2%}		U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{0,9%}
(37)	0,2 %	U ^{1,2%}	U ^{1,3%}	U ^{1,4%}	2,5 %	39 %		U ^{1,1%}		+							
(48)	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	0,3 %	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}				U ^{1,7%}		U ^{2,4%}	U ^{1,7%}		U ^{2,2%}			

Blau markiert sind simultan mit X- und Y-FISH-Sonden und BCR/ABL-FISH-Sonden hybridisierte Proben, Prozentwerte in blau kennzeichnen den Anteil tumormarker-positiv rezipienter Zellen. Bei Proben, die mit U^{x%} markiert sind, ist der Anteil rezipienter Zellen unter der Nachweisgrenze von X%; mit „+“ ist der Todeszeitpunkt markiert.

Fazit: Das Auftreten von tumormarker-positiv rezipiente Zellen mit einem Anteil von 0,2% bzw. 0,3% im Monat 3 ist bei beiden Patienten (32 und 48) ohne erkennbare klinische Konsequenz. Dem Auftreten (in Monat 1 nach Transplantation) von 0,2% tumormarker-positiv rezipiente Zellen folgt bei Patient 37 im Monat 5 ein Rezidiv.

Bei 2 von 7 Patienten wurden neben tumormarker-positiv auch tumormarker-negativ rezipiente Zellen nachgewiesen. Patient 30 hatte im Monat 9 nach Transplantation 9 (1,5%) rezipiente Zellen, wobei 8 (90%) davon tumormarker-positiv waren. Bei Patient 38 wurden im 1. Monat nach Transplantation 3 (0,4%) rezipiente Zellen gefunden. Bei dieser Probe war eine (25%) tumormarker-positiv. Patient 30 verstarb an einer GvHD im Monat 32. Der Betrachtungszeitraum von Patient 38 betrug 38 Monate. Tabelle 17 zeigt den Verlauf der Krankheit der 2 Patienten aus dieser Gruppe.

Tabelle 17: Posttransplantärer Verlauf der Patienten mit tumormarker-positiv und tumormarker-negativ rezipienten Zellen

Patienten Nr.	Monate 1	nach 2	Tx 3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
(30)					U ^{2,1%}		3,5 %		1,5%/90%	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,5%}	U ^{1,5%}			
(38)	0,4%/25%	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,2%}	U ^{1,1%}	U ^{0,9%}		U ^{0,9%}	U ^{1,2%}		U ^{0,9%}	U ^{1,3%}		U ^{0,9%}	U ^{1,3%}	U ^{1,2%}

Patienten Nr.	Monate 17	nach 18	Tx 19	20	21	22	23	25	26	28	30	32	33	35	38
(30)	U ^{1,5%}	U ^{1,5%}		U ^{1,4%}	U ^{1,5%}	U ^{1,3%}	U ^{1,3%}	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,3%}		+			
(38)	U ^{1,2%}		U ^{1,3%}	U ^{1,2%}			U ^{1,1%}		U ^{1,1%}		U ^{1,1%}		U ^{1,1%}	U ^{1,3%}	U ^{1,2%}

Blau markiert sind simultan mit X- und Y-FISH-Sonden und BCR/ABL-FISH-Sonden hybridisierte Proben, Prozentwerte in blau kennzeichnen neben dem Gesamtanteil rezipienter Zellen den Anteil tumormarker-positiv rezipienter Zellen. Bei Proben, die mit U^{x%} markiert sind, ist der Anteil rezipienter Zellen unter der Nachweisgrenze von X%; mit „+“ ist der Todeszeitpunkt markiert.

Fazit: Tumormarker-positiv und tumormarker-negativ rezipiente Zellen können gemeinsam in einer Probe vorkommen. Der Nachweis von 8 bzw. 3 tumormarker-positiv rezipienten Zellen bei Patient 30 bzw. 38 ist ohne erkennbare Verbindung mit einem bestimmten klinischen Ereignis.

Bei den letzten 2 der 7 Patienten mit tumormarker-positiv rezipienten Zellen wurden im Gegensatz zu den davor beschriebenen in mehr als einer Probe tumormarker-positiv als auch tumormarker-negativ rezipiente Zellen gefunden. Patient 39 hatte im Monat 5 nach Transplantation 0,1% rezipiente Zellen (1 Zelle) die tumormarker-positiv war (100%) und im Monat 10 nach Transplantation 0,2% rezipiente Zellen, wovon 1 von 2 (50%) Tumormarker positiv war. Bei Patient 43 wurden im ersten und zweiten Monat nach Transplantation rezipiente Zellen gefunden. Im ersten Monat betrug der Anteil rezipienter Zellen 0,8%, wovon alle 8 Zellen (100%) tumormarker-positiv waren, im zweiten Monat betrug der Anteil rezipienter Zellen 6% (23 Zellen), wovon keine tumormarker positiv war. Tabelle 18 zeigt den Verlauf der Krankheit der beiden Patienten.

Tabelle 18: Posttransplantärer Verlauf der Patienten mit Tumormarker positiv und Tumormarker negativ rezipienten Zellen in zwei Proben

Patienten Nr.	Monate 1	nach 2	Tx 3	4	5	9	10	11	13	14	17	22	28	33	39	48
(39)	U ^{2,7%}				0,1%/100%	U ^{1,7%}	0,2%/50%	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,5%}	U ^{2,4%}	U ^{2,5%}	U ^{2,5%}	U ^{2,3%}	U ^{1,7%}	U ^{2,2%}
(43)	0,8%/100%	6%/0%	64 %	+												

Blau markiert sind simultan mit X- und Y-FISH-Sonden und BCR/ABL-FISH-Sonden hybridisierte Proben, Prozentwerte in blau kennzeichnen neben dem Gesamtanteil rezipienter Zellen den Anteil tumormarker-positiv rezipienter Zellen. Bei Proben, die mit U^{x%} markiert sind, ist der Anteil rezipienter Zellen unter der Nachweisgrenze von X%; mit „+“ ist der Todeszeitpunkt markiert.

Bei 9 von 12 Patienten, bei denen ein Tumormarker bekannt war, wurden rezipiente Zellen nachgewiesen. Bei 7 davon wurden tumormarker-positiv rezipiente Zellen nachgewiesen. 3 von 7 Patienten mit tumormarker-positiv rezipienten Zellen sind verstorben (43%) (Patient 30 37, 43). Patient 43 verstarb 4, Patient 37 10 und Patient 30 32 Monate posttransplantär. Außerdem verstarb Patient 4 nach 19 Monaten. Bei ihm konnten keine tumormarker-positiv rezipienten Zelle nachgewiesen werden.

Die simultane Hybridisierung von Gonosomen und Tumormarkern zeigt, dass es Patienten gibt, die tumormarker-negativ und tumormarker-positiv rezipiente Zellen im posttransplantären Verlauf aufweisen.

Tumormarker-positive und tumormarker-negative Zellen können in einer Probe gemeinsam vorkommen.

Patienten mit tumormarker-positiven Zellen und solche mit ausschließlich tumormarker-negativen Zellen haben eine vergleichbare Überlebenswahrscheinlichkeit.

7 Diskussion

Die Chimärismusanalyse nach gegengeschlechtlicher Stammzelltransplantation ist ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel für die posttransplantäre Prognose- und Therapieabschätzung (McCann und Lawler 1993, Buño et al. 2003, Bader et al. 2004), welche in den letzten 10 Jahren beträchtlich an Bedeutung gewonnen hat. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung spielte dabei eine Hauptrolle (Amare et al. 2001). Sie gewinnt zunehmend inhaltlich an Bedeutung, ist aber in der Routinediagnose durch den personellen Aufwand erschwert. Diese Arbeit beschreibt deshalb die Aussagekraft und Nachweisgrenzen von mittels FISH erhobenen Chimärismusdaten und zeigt auch die Möglichkeiten einer Automatisierung des Analyseverfahrens auf. Die Automatisierung forderte hier ein technisches Equipment, das bisher in kleineren oder mittelgroßen Routinelaboratorien nicht vorlag, aber zunehmend zur Standardisierung zählt. Der Kostenfaktor bei dem hier verwendeten Analysesystem (Metafer/MetaCyte (Plesch und Lörch 2001)) der Firma MetaSystems, nebst Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss, beträgt circa 90.000,--€. Eine Voraussetzung für diese Arbeit war deshalb die Etablierung einer automatisierten FISH-Analyse zur Erfassung von männlichen und weiblichen Zellen nach gegengeschlechtlicher Transplantation, um anschließend die retrospektive Untersuchung von konservierten Patientenproben durchzuführen. Das korrekte Erfassen von Zellkernen und FISH-Signalen ist aufgrund der Variabilität in Größe, Form und Intensität die größte Herausforderung bei der automatischen Analyse (Truong et al. 1997). So war es auch hier erforderlich, Parameter für die Zell- und Signalerkennung zu optimieren. Die Fokusebene wurde zuerst annähernd in der Z-Achse mit einem Abstand von 50µm ausgemessen. Danach erfolgte die Feinabstimmung mit einem Abstand von 0,375µm. Dadurch konnte die Ebene, in der die Zellkerne liegen, präzise bestimmt werden. Der Vorteil dabei ist, dass somit bei jedem Objektträger individuell bestimmt wird, in welcher dreidimensionalen Ebene die Zellkerne liegen. Das ist eine wichtige Voraussetzung, damit die Zellkerne und Signale scharf aufgenommen werden können und die Software Signale richtig zählt. Voruntersuchungen zeigten, dass bei unscharfen Signalen oder Objektträgern mit stärkerem Hintergrund der Anteil der Falschzählung bedeutend höher war, da die Software nicht zwischen zu zählendem Signal und Hintergrundsignal unterscheiden konnte. Bei der Untersuchung des analytischen Fensters für die minimal und maximal zulässige Zellkerngröße zeigte sich, dass der geringste Fehler (1% falsch erfasste

Kerne) zwischen 7-14µm lag. Aufgrund dieser Daten und der theoretisch anzunehmenden Zellkerngrößenvarianz von 5-16µm (Alberts et al. 2005) erscheint diese Einstellung adäquat, allerdings muss damit gerechnet werden, dass selektiv Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden. Das betrifft Zellen <7µm (kleine Lymphozyten und Granulozyten) und Zellen >14µm (große Blasten). Obwohl die genannten Zellen nicht gezählt werden, ist dieses Fenster, auch bei einer Blastenkrise vertretbar, da bei dieser auch kleine Blasten überproportional ansteigen. Die automatisierte Zellkernerfassung ist nur dann sinnvoll, wenn sie effektiver ist als die manuelle Auswertung. Deshalb war es wichtig, die manuelle Auswertzeit von 150 Minuten für 3000 Zellkerne zu unterbieten. Die erste automatische Zellkernerfassung betrug für 3000 Zellkerne 168 Minuten. Deshalb war eine Beschleunigung der maschinellen Auswertung erforderlich. Das wurde zum einen dadurch erreicht, dass die normale Auftropfdichte der Zellen auf dem Objektträger von 100.000 Zellen/cm² für die manuelle Auswertung auf 450.000 Zellen/cm² erhöht wurde. Zum anderen wurde die Kameraverstärkung auf Gain 4 gesteigert. Außerdem wurde statt eines 40er Objektivs ein 20er Objektiv verwendet, da die Vergrößerung die Hauptrolle bei der zeitlichen Effektivierung der automatisierten Analyse spielt (Johnson et al. 2007). Durch diese Maßnahmen verkürzte sich die Auswertung von 3000 Zellkernen um 100 Minuten (60%), das heißt die Einführung der automatischen Analyse bringt eine Arbeitszeiterparnis von 83 Minuten gegenüber der manuellen Auswertung (150 vs. 67 Minuten). Das ist vor allem im Hinblick auf die Etablierung der Methode für die Routinediagnose wichtig. Zudem bleichen die Fluoreszenzsignale durch die kürzere Analysezeit nicht so schnell aus. Ein großer Vorteil von Metafer ist, dass alle Zellkerne als Bilddaten aufgenommen werden. Gleichzeitig speichert das System die Koordinaten aller Zellkerne. Über einen Referenzpunktvergleich kann so später jeder Zellkern für weitere Studien angefahren und manuell beurteilt werden. Die Stärke der automatischen FISH-Analyse liegt zweifellos in der Möglichkeit, eine große Anzahl Zellen zu betrachten und geringe Anteile positiver Zellen zu detektieren. Zwischen der manuellen und automatisierten Auswertung besteht eine lineare Korrelation ($R^2=0.985$) (Kajtar et al. 2006). Das erlaubt manuell erfasste Ergebnisse mit automatisch erfassten zu vergleichen. Bisher gibt es kein empfohlenes und allgemein anerkanntes Protokoll für die quantitative FISH-Analyse (Antin et al. 2001, Iourov et al. 2005, Buño et al. 2005), was aber zur Vergleichbarkeit der Daten zwischen verschiedenen Zentren unbedingt erforderlich wäre. Hierbei könnten auch identische Classifier bei der

automatisierten Chimärismusanalyse helfen (Varga et al. 2004). Vergleicht man die zwei Methoden FISH und PCR in der Chimärismusanalyse, so zeigt sich, dass beide identische Ergebnisse liefern (Jolkowska et al. 2005). Die Sensitivität der PCR beträgt 3-5% und erlaubt nur eine semiquantitative Abschätzung (Bader et al. 1998, Dubovsky et al. 1999), wogegen die FISH-Analyse eine geringfügig bessere Sensitivität (1%) hat und voll quantitativ ist (Dewald et al. 1993). Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten empfiehlt es sich, nur eine Analysemethode für die Routinediagnose zu wählen (Buño et al. 2005). Das ermöglicht das Vergleichen der Ergebnisse in den Verlaufskontrollen. Bei Patienten mit komplettem Chimärismus sollte aber die Methode mit der höchsten Sensitivität gewählt werden, um das Auftreten von rezipienten Zellen möglichst früh zu erkennen (Serrano et al. 2000, Bader et al. 2004).

Aufgrund des systemischen Fehlers bei der automatisierten Chimärismusanalyse war es erforderlich, die Nachweisgrenze für die XY-FISH-Analyse zu bestimmen. Deshalb wurden bei 10 weiblichen Probanden in 26633 Zellen nach männlichen Zellen und bei 11 männlichen Probanden in 35783 Zellen nach weiblichen Zellen, mit den in Kapitel 5.6 und 6.1 beschriebenen Einstellungen, mit Metafer gesucht. Die automatische Analyse ergab einen Fehler für falsch eingestuft männlich von 0,97% (257 Zellen) und falsch eingestuft weiblich von 0,4% (142 Zellen). Durch visuelle Kontrolle konnte dieser Fehler auf 0,14% (38 Zellen) für falsch eingestuft männlich und 0,08% (27 Zellen) für falsch eingestuft weiblich reduziert werden. Mit diesen Fehlerwerten wurde die Nachweisgrenze berechnet und es konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze von der Summe ausgewerteter Zellen einer Probe abhängt (Abbildung 6). Das schafft die Möglichkeit, individuell für jede Probe die Nachweisgrenze zu bestimmen, was wichtig ist im Hinblick auf unterschiedliche Probenmengen, die für die Diagnose zur Verfügung stehen. Trakhtenbrot et al. (2002) beschreibt einen nahezu identischen Fehler bei 2452 ausgewerteten weiblichen Zellkernen für falsch eingestuft männlich von 0,16% für die manuelle Auswertung. Der Fehler für falsch eingestuft weiblich wurde von ihm nicht bestimmt. Die Differenz der Fehlerrate für männliche Zellen zwischen der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Trakhtenbrot et al. von 0,08% könnte darin liegen, dass wir eine höhere Zellkernzahl zur Fehlerbestimmung ausgewertet haben. Auch Trakhtenbrot et al. zeigt die Abhängigkeit der Nachweisgrenze von der Summe ausgewerteter Zellen.

Bei Frauen, die Söhne geboren haben, können männliche Zellen bis 27 Jahre (Bianchi et al. 1996) bzw. bis 38 Jahre (Adams et al. 2003) postpartum im Blut nachgewiesen werden. Ausgehend von der geringsten nachgewiesenen Menge männlicher Zellen von 1 gEq/mil, die bei solchen Frauen gefunden wurden, könnte eine Spenderin 10.000 bis 40.000 Zellen bei einer normalen PBSCT übertragen. In einem solchen Fall könnte die posttransplantäre Chimärismusuntersuchung männliche Zellen nachweisen, die fälschlich als rezipiente Zellen interpretiert würden. Das sollte bei der individuellen Betrachtung bei Patienten mit weiblichen Spendern, die Söhne haben berücksichtigt werden. Das heißt, im Klinikalltag muß bei der Anamnese der weiblichen Spender das Geschlecht eventuell geborener Kinder mit registriert werden.

Eine Beobachtung, die bei zwei Patientenproben gemacht wurde, war die Anhäufung von männlichen rezipienten Zellen in Zellinseln auf dem Objektträger bei klinisch unauffälligen Patienten. Abbildung 13 eine solche Zellinsel. Es scheint, als ob die Zellen fadenartig miteinander verwoben sind. Daraus ergab sich die Frage, woher diese Vernetzung stammt und ob die Zellen histologisch einen anderen Ursprung haben. Experimentell wurde dieser Frage nicht nachgegangen. Vermutet wird, dass bei der venösen Blutabnahme Endothelzellen als Stanzkörper mit in die Stechkanüle gelangten. Als Konsequenz dieser Beobachtung wurde dafür gesorgt, dass für die Chimärismusanalyse in der vorliegenden Arbeit ab dem Beobachtungszeitpunkt dieser Zellinseln die zweite oder dritte Monovette der Blutabnahme verwendet wurde.

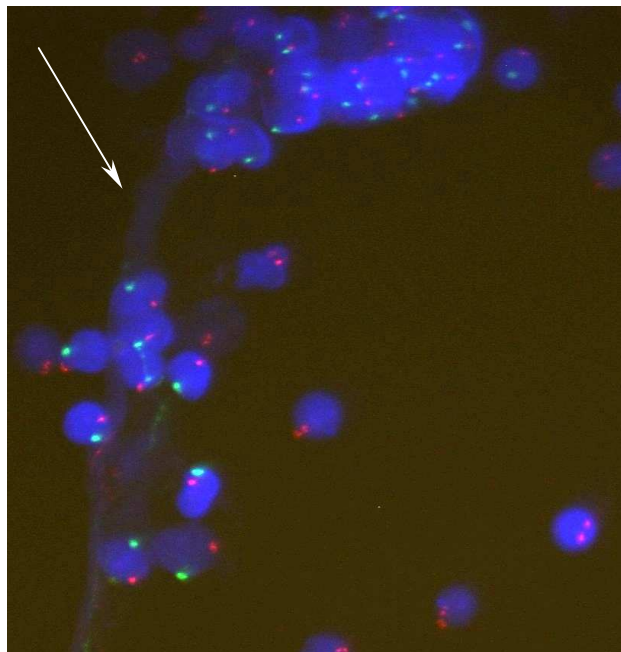


Abbildung 13: Männlich-rezipiente Zellen mit je einem roten und grünen Signal. Die enge Anordnung scheint durch fadenartige Gebilde (Pfeil) miteinander verbunden zu sein.

Im Hinblick auf die unter 6.3.2-6.3.4 dargestellten Ergebnisse mussten die Fehlergrenzen für Trisomie 8-positive und BCR/ABL-positive-Zellen ermittelt werden, damit die Nachweisgrenzen für die kombinierte Hybridisierung der Tumormarkergene mit den XY-Zentromeren errechnet werden konnten (siehe unten). Die Falschpositivrate für Trisomie 8 betrug 1,2%. Sie ist identisch mit der von Jenkins et al. (1992) und Cuneo et al. (1998) bestimmten Falschpositivrate für Trisomie 8. Die Falschpositivrate für BCR/ABL-Fusion betrug 0,66%. Sie ist ähnlich der von Amiel et al. (1994), Van den Berg et al. (1996) und Mühlmann et al. (1998) nachgewiesenen Falschpositivrate für BCR/ABL-Fusion. Aber es gibt auch Publikationen, in denen höhere Falschpositivraten um 2% bis 10% beschrieben sind (Dewald et al. 1993, Chase et al. 1997, Tanaka et al. 1997, Rieder et al. 1998, Cohen et al. 2000). Der Unterschied könnte: 1) durch unterschiedliche Kerngröße des verwendeten Untersuchungsmaterials (peripheres Blut oder Knochenmark) oder 2) durch das Vorliegen verschiedener Phasen im Zellzyklus (G1,G2) oder 3) in der unterschiedlichen Chromatinstruktur bei gesunden und sterbenden Zellen begründet sein (Kowalczyk et al. 2003).

Mit den falsch Positivraten (für Trisomie 8 und BCR/ABL-Fusion) und den Falschpositivraten für männlich und weiblich (Tabelle 8) wurden mittels 95er-Quantil die Nachweisgrenzen zum Nachweis von tumormarker-positiven rezipienten Zellen abgeschätzt. Dabei ergab sich für beide Tumormarker eine Nachweisgrenze von 0,003% für Patienten und 0,005% für Patientinnen. Der Vorteil dieser Kombination (Markierung von Tumormarkern und Gonosomen) ist die hohe Sensitivität. Sie ermöglicht den Nachweis *einer* tumormarker-positiven Zelle unter 20.000 betrachteten Zellen. Diese hohe Sensitivität wird durch die PCR als Alternativmethode nicht erreicht. Durch die hohe Sensitivität der kombinierten Hybridisierung konnte bei 7 Patienten tumormarker-positive (BCR/ABL) rezipiente Zellen nachgewiesen werden. Dieser Befund könnte durch eine BCR/ABL-PCR bestätigt werden, was aber experimentell nicht durchgeführt wurde, da die PCR RNA nachweist und die Tumorlastangabe der PCR schwer mit der der Tumorzell-Angabe der FISH zu synchronisieren ist.

Die mit der Kombination von Tumormarkergenen und Gonosomen erreichte Sensitivität wurde schon von Carothers (1994) zur Erkennung von malignen residualen Resterkrankungen gefordert.

Um herauszufinden ob der Anteil rezipienter Zellen einen Zusammenhang mit einem Rezidiv hat, wurden 454 Proben von 58 Patienten untersucht. Dabei zeigten 33 Patienten einen kompletten und 25 einen inkompletten Chimärismus. 13 von 25 Patienten hatten rezipiente Zellen $<4\%$ und 12 hatten rezipiente Zellen $>4\%$. 7 von 8 Patienten verstarben aus der Gruppe $>4\%$ rezipienter Zellen an einem Rezidiv. Es besteht deshalb erwartungsgemäß eine deutliche Korrelation zwischen dem Auftreten von rezipienten Zellen $>4\%$ und dem Auftreten eines Rezidivs, so wie in der Literatur beschrieben (Palka et al. 1996, Bader et al. 2000, Liu et al. 2005). Zur Rezidivfrüherkennung wird aber nicht das einmalige Auftreten eines inkompletten Chimärismus, unter dem man den gleichzeitigen Nachweis von hämatopoetischen Stammzellen des Spenders und Empfängers versteht (Koch 2006), sondern die Dynamik des Chimärismus im Verlauf herangezogen. Das heißt, ein ansteigender inkompletter Chimärismus deutet auf ein Rezidiv hin (Ramirez et al. 1996). Dafür sind Verlaufskontrollen in engen Intervallen (1-3 Tage) erforderlich. In der vorliegenden Arbeit, in der retrospektiv asservierte Proben nach Transplantation betrachtet wurden, ist aber auch ein Zusammenhang zwischen dem einmaligen Auftreten von rezipienten Zellen und einem Rezidiv deutlich. Allerdings sind die Verlaufskontrollen in unterschiedlichen Intervallen durchgeführt worden. So sind aus dem Patientengut 66,7% der Patienten mit rezipienten Zellen $>4\%$ an einem Rezidiv verstorben. Die mediane Zeit zwischen erstem Auftreten von rezipienten Zellen und Rezidiv liegt bei 6 Monaten. Diese Zahl ähnelt der von Uzunel et al. (2003), der eine mediane Zeit von 5,5 Monaten feststellte. Zu einem ganz anderen Resultat kommen drei andere Arbeiten, die keinen Zusammenhang zwischen inkomplettem Chimärismus und Rezidivrate sehen (Schattenberg et al. 1989; Schaap et al. 2002, Shimoni et al. 2002). Schaap relativiert das Ergebnis, indem er zwischen inkomplettem Chimärismus im 6. Monat, der nicht mit einem höheren Rezidivrisiko korreliert, und einem inkompletten Chimärismus im 12. Monate, wo eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einem Rezidiv zu erkranken, besteht, differenziert. Demgegenüber rezidierten in einer Arbeit von Huisman et al. (2007) 29 von 33 Patienten mit inkomplettem Chimärismus vor dem 12. Monat. Inwieweit ein inkompletter Chimärismus zur Rezidivfrüherkennung herangezogen werden kann, ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine mögliche Ursache könnte in der Anwendung verschiedener Protokolle sein.

In der vorliegenden Arbeit verstarben 11 (58%) von 58 Patienten innerhalb der ersten 12 Monate nach Transplantation (Abbildung 8). Betrachtet man die Daten, so konnten

nicht bei jedem Rezidiv im Vorfeld rezipiente Zellen nachgewiesen werden. Umgekehrt war der Nachweis von rezipienten Zellen in den ersten Monaten nach Transplantation auch kein Marker für ein unmittelbares Rezidiv. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die untersuchten Proben nicht von Studienpatienten stammen, so dass die posttransplantäre Therapie in der untersuchten Kohorte sehr heterogen ist. Insbesondere beim Nichtauftreten eines Rezidivs kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund des FISH-Ergebnisses die Therapie (z.B. Modulation der Immunsuppression) geändert wurde.

Proben mit rezipienten Zellen <4% treten zu 80% in den ersten 12 Monaten nach Transplantation auf, Proben mit >4% rezipienten Zellen sind relativ zum Probenvolumen des jeweiligen Abnahmezeitpunktes gleichverteilt. Es wird vermutet, dass die kurz nach Transplantation nachgewiesenen rezipienten Zellen übriggebliebene, nicht durch die Konditionierung eliminierte Zellen darstellen (Lebensdauer von Lymphozyten 2-4 Tage). Unter den Fällen mit rezipienten Zellen >4% sind die Patienten (67%), die ein Rezidiv entwickelten. Bei der Betrachtung des Transplantationsalters im Vergleich zum Auftreten von rezipienten Zellen <4% und >4% konnte kein Unterschied festgestellt werden. In beiden Gruppen lag das Transplantationsalter zwischen 10-55 Jahren (Median=46) bzw. 0-66 Jahren (Median=49), sodass das Transplantationsalter und das Auftreten von rezipienten Zellen <4% und >4% nicht miteinander korrelieren. Ein Vergleich von metakin und klassisch konditionierten Patienten und das Auftreten von rezipienten Zellen <4% und >4% zeigt, dass die metakin konditionierten Patienten zu 67% rezipiente Zellen >4% entwickelten, während die klassisch konditionierten zu 54% rezipiente Zellen <4% aufwiesen. Die prognostisch ungünstigeren Fälle (höheres Transplantationsalter) werden in der Regel eine metakine Konditionierung erfahren haben (Sayer et al. 2003b). Die Ergebnisse unserer Studie zeigen erwartungsgemäß, dass die metakin konditionierten Patienten ein höheres Risiko zu rezidivieren haben. Trotzdem wird die metakine Konditionierung durchgeführt, da gezeigt wurde, dass die Mortalität, die nicht mit einem Rezidiv assoziiert werden kann (z.B. durch Infektion), geringer ist (Aurer et al. 1991).

Bei 12 Patienten konnten die Proben auf die Anwesenheit der geschlechtsspezifischen und tumorspezifischen FISH-Signalmuster hin untersucht werden. Von diesen 12 hatten 2 Patienten je eine Probe mit ausschließlich tumormarker-negativen Residualzellen und

7 Patienten hatten tumormarker-positive Residualzellen. Bei 3 Patienten konnte keine Residualzelle nachgewiesen werden. Die Untersuchung zeigt, dass innerhalb einer Probe sowohl tumormarker-positive als auch tumormarker-negative rezipiente Zellen gefunden werden können (bei 4 von 7 Patienten). Der Anteil der tumormarker-positiven Residualzellen in Bezug auf den Anteil gefundener rezipienter Zellen betrug in diesen Proben zwischen 25% und 90%. Bei keinem der 7 Patienten korreliert der Nachweis von tumormarker-positiven rezipienten Zellen mit dem unmittelbaren Auftreten eines Rezidives und auch nicht mit einer niedrigeren mittleren Überlebenschance. Demgegenüber konnte Führer et al. (2005) tumormarker-positive rezipiente Zellen vor einem Rezidiv nachweisen. Thiele et al. (2002) hat ebenfalls eine Simultanhybridisierung von Gonosomen-DNA und Tumormarkergenen durchgeführt und vermutet, dass tumormarker-tragende (maligne) Vorläuferzellen die myeloablative Therapie überleben und die Quelle für ein Rezidiv darstellen. In 3 Proben wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich tumormarker-negative rezipiente Zellen gefunden. Diese könnten 1) gesunde Leukozyten sein, die eventuell nicht durch die (metakine) Konditionierung eliminiert wurden, oder 2) Vorstufen von Tumorzellen darstellen, die den Tumormarker noch nicht aufweisen. Aufgrund der in dieser Arbeit bestimmten Falschnegativraten von 1% für BCR/ABL und 20% für Trisomie 8 könnten tumormarker-negative rezipiente Zellen auch 3) falsch negative tumormarker-positive Zellen sein. Das könnte jede fünfte Zelle bei Patienten mit dem Tumormarker Trisomie 8 betreffen. Ebenso könnten tumormarker-negative rezipiente Zellen wie oben genannt 4) Endothelzellen sein, die bei der Blutabnahme als Stanzkörper mit in die Monovette gelangten oder 5) von weiblichen Spendern mit Söhnen stammen. Der letzte Punkt trifft wahrscheinlich nur auf eine Minderheit der männlichen Patienten zu.

Ein besonderer Aspekt dieser Arbeit ist die kombinierte Hybridisierung von Tumormarkern und Gonosomen. Es konnte gezeigt werden, dass tumormarker-positive Residualzellen im posttransplantären Verlauf, bezogen auf die Anzahl ausgewerteter Zellen, bis zu 1,3% zu finden sind. Der Nachweis von tumormarker-positiven Residualzellen in diesen geringen Mengen korrelierte nicht mit einem erkennbaren klinischen Ereignis wie z.B. einem Rezidiv. Pro Patient wurden zwischen 1 bis 8 tumormarker-positive rezipiente Zellen gefunden. Diese Analyse basiert auf kleinen Zahlen, die keine Statistik erlaubten. Um eine Aussage darüber machen zu können, ob der Nachweis von tumormarker-positiven rezipienten Zellen ein Marker für eine

Rezidivfrüherkennung ist, muss ein größeres Patientengut untersucht werden. Die simultane Hybridisierung von X- und Y-FISH-Sonden mit Tumormarkern ist aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze eine sensitive Methode, um Tumorzellen nachzuweisen.

8 Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine automatisierte FISH-Chimärismusanalyse etabliert und in Patientenproben untersucht, inwieweit das Auftreten von Rezipientenzellen mit einem Rezidiv korreliert. Außerdem wurde untersucht, ob die Rezipientenzellen einen Tumormarker (BCR/ABL bzw. Trisomie 8) tragen. Folgende Ergebnisse lassen sich ableiten:

1. Die automatisierte FISH-Chimärismusanalyse ist eine robuste und sensitive Methode, die für die Routinediagnose geeignet ist, um
2. wirtschaftlich und effektiv den Anteil an Rezipientenzellen bei Patienten nach Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation nachzuweisen.
3. Der Anteil rezipienter Zellen korreliert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit. Es gibt Patienten mit Rezipientenzellen <4%, ohne dass sie an einem Rezidiv erkranken.
4. Die Simultanhybridisierung von Gonosomen und Tumormarkern ist aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze eine sensitive Methode, um tumormarker-positive Zellen nachzuweisen.
5. Der Nachweis von tumormarker-positiven Rezipientenzellen bis 1,3% korreliert nicht mit einem Rezidiv.
6. Tumormarker-positive und tumormarker-negative rezipiente Zellen können gemeinsam in einer Probe vorkommen.
7. Es gibt Patienten mit ausschließlich tumormarker-negativen Rezipientenzellen zu einem Anteil bis 3,3%, die nicht an einem Rezidiv erkranken.
8. Die genaue Herkunft tumormarker-negativer Rezipientenzellen ist unklar und sollte in weiteren Forschungsstudien mit größerem Patientenkollektiv untersucht werden.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

Adams KM, Lambert NC, Heimfeld S, Tylee TS, Pang JM, Erickson TD, Nelson JL (2003): Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood* 102(10): 3845-3847.

Akel S, Kolialexi A, Mavrou A, Metaxotou A, Loukopoulos D, Yataganas X (2003): Efficiency of interphase fluorescence in situ hybridization for BCR/ABL on peripheral blood smears for monitoring of CML patients: a comparison with bone marrow findings. *Clin Lab Haem* 24:361-367.

Alberts B, Bray D, Hopkins K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005). *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH, Weinheim. 1.Kap.

Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S (2001): Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 131:125-134.

Amiel A, Yarkoni S, Slavin S, Or R, Lorberboum-Galski H, Fejgin M, Nagler A (1994): Detection of minimal residual disease state in chronic myelogenous leukemia patients using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 76(1):59-64.

Amiel A, Elis A, Manor Y, Tangi I, Fejgin M, Lisshner M (1996): Fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of trisomy 8 in acute myeloblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 23(5-6):603-607.

Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, Weisdorf D (2001): Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: Recommendation from a workshop at the 2001 tandem meetings. *Blood marrow Transplant* 7:473-485.

Aurer I, Gale RP (1991): Are new conditioning regimens for transplants in acute myelogenous leukemia better? *Bone Marrow Transplant*. 7(4):255-261.

Bader P, Holle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J (1997): Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant* 19(7):697-702.

Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingebiel T (1998). Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 21:487-495.

Bader P, Stoll K, Huber S, Geiselhart A, Handgretinger R, Niemeyer C, Einsele H, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J, Klingebiel T (2000): Characterization of lineage-specific chimaerism in patients with acute leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse. *Br J Haematol* 108:761-768.

Bader P, Kreyenberg H, Hölle W, Dückers G, Handgretinger R, Lang P, Kremens B, Dilloo D, Sykora KW, Schrappe M, Niemeyer C, Von Stackelberg A, Gruhn B, Henze G, Greil J, Niethammer D, Dietz K, Beck JF, Klingebiel T (2004): Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavourable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy. *J Clin Oncol* 22:1696-1705.

Barnes DW, Loutit JF (1955): The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *J Natl Cancer Inst.* 15(4):901-905.

Barrios M, Jiménez-Velasco A, Róman-Gómez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, Heiniger A (2003): Chimerism status is a useful predictor of relaps after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 88:801-810.

Bertz H, Illerhaus G, Veelken H, Finke J (2002): Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for patients with relapsed or refractory lymphomas: comparison of high dose conventional versus fludarabine-based reduced-intensity regimens. *Annals of Oncology* 13:135-139.

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA (1996): Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 23;93(2):705-708.

Buño I, Anta B, Moreno-López E, Balsalobre P, Balas A, García-Sánchez F, Serrano D, Carrion R, Gómez-Pineda A, Díez-Martín J (2003): Lineage-specific chimaerism quantification after T-cell depleted peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 44: 659-667.

Buño I, Nava P, Simon A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P, Serrano D, Carrión R, Gómez-Pineda A, Díez-Martín J (2005): A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Hematologica* 90:1373-1379.

Carothers AD (1994): Counting, measuring, and mapping in FISH-labelled cells: sample size considerations and implications for automation. *Cytometry* 1;16(4):298-304.

Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M (1997): Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 18(4):246-253.

Cilloni D, Guerrasio A, Giugliano E, Scaravaglio P, Volpe G, Rege-Cambrin G, Saglio G (2002): From Genes to therapy: the case of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Ann N Y Acad Sci* 963:306-312.

Cohen N, Novikov I, Hardan I, Esa A, Brok-Simoni F, Amariglio N, Rechavi G, Ben-Bassat I, Trakhtenbrot L (2000): Standardization criteria for the detection of BCR/ABL fusion in interphase nuclei of chronic myelogenous leukemia patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 123(2):102-108.

Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG, Bardi A, Rigolin GM, Piva N, Mancini M, Nanni M, Alimena G, Mecucci C, Matteucci C, La Starza R, Bernasconi P, Cavigliano P, Genini E, Zaccaria A, Testoni N, Carboni C, Castoldi G (1998): Detection and monitoring of trisomy 8 by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia: a multicentric study. *Haematologica.* 83(1):21-26.

Das M, Saikia TK, Adveni SH, Parikh PM, Tawde S (2003): Use of a reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic transplantation in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 32, 125-129.

Dausset A (1958): Iso-leuco-anibodies. *Acta. Haematol.* 20(1-4):156-166.

Delbrück H (2001): Knochenmark – und Stammzelltransplantation nach Krebs, 1. Auflage, Stuttgart: Novartis Oncology.

Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Law ME, Zinsmeister AL, Stalboerger PG, Jalal SM, Ash RC, Jenkins RB (1993): Fluorescence in situ hybridization with X and Y chromosome probes for cytogenetic studies on bone marrow cells after opposite sex transplantation. *Bone Marrow Transplant* 12:142-154.

Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, Gadner H, Lion T (1999): Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 13:2060-2069.

Durnam DM, Anders KR, Fisher L, O'Quigley J, Bryant EM, Thomas ED (1989): Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood* 74(6):2220-2226.

Elmaagacli AH (2007): Molecular methods used for detection of minimal residual disease following hematopoietic stem cell transplantation in myeloid disorders. *Methods Mol Med.* 134:161-178.

Ewing Bartz PA (2004): Strategien zur Prävention und Therapie endothelialer Schäden nach allogener Stammzelltransplantation [Dissertation]. Universität Regensburg.

Führer M, Gerusel-Bleck M, Konstantopoulos N, Bender-Goetze C, Walther JU (2005): FISH analysis of native smears from bone marrow and blood for the monitoring of chimerism and clonal markers after stem cell transplantation in children. *Int J Mol Med.* 15(2):291-297.

Gebhart E, Liehr T, Harrer P, Reichardt S, Schmitt G, Thoma K, Gramatzki M, Trautmann U (1995): Determination by interphase-FISH of the clonality of aberrant karyotypes in human hematopoietic neoplasias. *Leuk Lymphoma.* 17(3-4): 295-302.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Bruckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974): Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18(4):295-304.

Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ (2001): Acute graft-vs-host disease: pathology and management. *Exp Hematol* 29(3):259-277.

Gribble SM, Reid AG, Roberts I, Grace C, Green AR, Nacheva EP (2003): Genomic Imbalances in CML Blast Crisis: 8q24.12-q24.13 Segment Identified as a Common Region of Over-Representation. *Genes Chromosome Cancer* 17(7):1419-1421.

Hancock P, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG (2003): Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia* 17(1):247-251.

Henegariu O, Heerema NA, Lowe Wright L, Bray-Ward P, Ward DC, Vance GH (2001): Improvements in cytogenetic slide preparation: controls Chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43(2):101-109.

Huisman C, de Weger RA, de Vries L, Tilanus MGJ, Verdonck LF (2007): Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relaps in acute myeloid leukemia. *Bone marrow Transplant* 39; 285-291.

Huret JL (2008): Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology; <http://AtlasGeneticsOncology.org>.

Iourov IY, Soloviev IV, Vorsanova SG, Monakhov VV, Yurov YB (2005): An approach for quantitative assessment of fluorescence in situ hybridization (FISH) signals for applied human molecular cytogenetics. *J Histochem Cytochem* 53(3): 401-408.

Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, Borell TJ, Stalboerger PG, Davis EM, Penland L, Fernald A, Espinosa R 3rd, Schaid DJ, et al. (1992): Fluorescence in situ hybridization: a sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood*. 79(12):3307-3315.

Johnson KL, Stroh H, Khosrotehrani K, Bianchi DW (2007): Spot counting to locate fetal cells in maternal blood and tissue: A comparison of manual and automatic microscopy. *Microsc Res Tech* 70(7):585-588.

Jolkowska J, Pieczonka A, Strabel T, Borucki D, Wachowiak J, Bader P, Witt M (2005): Hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation: a comparison of quantitative analysis by automated DNA sizing and fluorescent in situ hybridization. *BMC Blood Disord*. 10;5(1):1.

Kajtar B, Mehes G, Lörch T, Deak L, Kneifne M, Alpar D, Pajor L (2006): Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei. *Cytometry A* 69(6):506-514.

Kim I, Lee KH, Choi Y, Keam B, Koo NH, Yoon SS, Yoo KY, Park S, Kim BK (2007): Allogeneic Stem Cell Transplantation for Patients with Advanced Hematological Malignancies: Comparison of Fludarabine-based Reduced Intensity Conditioning versus Myeloablative Conditioning. *J Korean Sci* 22(2):227-234.

Koch T (2006): Methods and results of stem cell transplantation from related donors in children with relapse of acute lymphoblastic leukemia according to the ALL-REZ BFM trials. [Dissertation]. Berlin: Freie Universität.

Kolb HJ (1998): Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties. Vox Sang. 74 Suppl 2, 321-329.

Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ (2003): Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. Blood 103(3):767-776.

Kowalczyk JR, Gaworczyk A, Winnicka D, Lejman M, Babicz M (2003): Fluorescence in situ hybridization BCR/ABL fusion signal rate in interphase nuclei of healthy volunteer donors: a test study for establishing false positive rate. Cancer Genet Cytogenet. 1;142(1):51-55.

Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR (1984): Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. Br J Haematol 56(3):431-443.

Liu Q, Song L, Zhang Y, Wei Y, Xu D, Sun J, Liu X, Xu B, Meng F, Zhou S (2005): The clinical significance of interphase fluorescence in situ hybridization monitoring chimeric status after sex-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. [Abstract]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 22(2): 212-215.

Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E (1951): Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst. 1951 Aug;12(1):197-201.

Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringdén O. (2001): Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia 15: 1976-1985.

McCann SR, Lawler M (1993): Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. Bone Marrow Transplant 11(2):91-94.

Mühlmann J, Thaler J, Hilbe W, Bechter O, Erdel M, Utermann G, Duba HC (1998): Fluorescence in situ hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML) during interferon treatment: a new strategy for remission assessment. Genes Chromosomes Cancer. 21(2):90-100

Nagler A, Slavin S, Yarkoni S, Fejgin M, Amiel A (1994): Detection of minimal residual disease after sex-mismatch bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 73(2): 130-133.

Nakao S, Zeng W, Yamazaki H, Wang H, Takami A, Sugimori N, Miura Y, Shiobara S, Matsuda T, Shinagawa Y, Harada M (1999): Early establishment of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in comparison with allogeneic bone marrow transplantation. Eur J Haematol 62(4):265-270.

Ostendorf P, Schaefer U, Zander AR (1997): Knochenmarktransplantation. In: Ostendorf P, Schaefer U Hrsg. Hämatologie Onkologie. München, Urban und Schwarzenberg Verlag, 222-236.

Palka G, Stuppia L, Di Bartolomeo P, Morizio E, Peila R, Franchi PG, Calarese G (1996): FISH detection of mixed chimerism in 33 patients submitted to bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 17(2): 23123-6.

Pfannkuch F (1995): Hämoetisches System. In: Blümke S. Hrsg. Pathologie. Berlin New York, Walter de Gruyter Verlag, 953-954.

Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83(9):2934-2938.

Plesch A, Lörch T (2001): Metafer – a novel ultra high throughput scanning system for rare cell detection and automatic interphase FISH scoring. In: Macek M, Bianchi D, Cuckle H: Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother, present state and perspectives. *Karolinum* 12:329-339.

Ramírez M, Díaz MA, García-Sánchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, Vicario JL, Madero L. (1996): Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 18(6):1161-1165.

Regn SS (2002): Simultane Expansion zytotoxischer T-Lymphozyten gerichtet gegen Adeno-und Epstein-Barr-Virus Epitope, zur Therapie von opportunistischen Infektionen nach allogener hämoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) [Dissertation]. München: Technische Universität.

Rieder H, Bonwetsch C, Janssen LA, Maurer J, Janssen JW, Schwartz S, Ludwig WD, Gassmann W, Bartram CR, Thiel E, Löffler H, Gökbüget N, Hoelzer D, Fonatsch C (1998): High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 12(9):1473-1481.

Santos GW (1968): The pharmacology of immunosuppressive drugs. *Pharmacol Physicians*. 2(8):1-6.

Sayer HG, Kasper C, Mugge LO, Schilling K, Hoffken K (2003a): Allogeneic blood stem cell transplantation in advanced chronic myeloid leukemia - high response rate associated with increased chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 88(7):831-833.

Sayer HG, Kröger M, Beyer J, Kiehl M, Klein SA, Schaefer-Eckart K, Schwerdtfeger R, Siegert W, Runde V, Theuser C, Martin H, Schetelig J, Beelen DW, Fauser A, Kienast J, Höffken K, Ehninger G, Bornhäuser M; Cooperative German Transplant Study Group (2003b): Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: disease status by marrow blasts is the strongest prognostic factor. *Bone Marrow Transplant* 31(12):1089-1095.

Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, Preijers F, Hillegers F, Knops R, Pennings A, Boezeman J, Geurts van Kessel A, de Pauw B, de Witte T (2002): Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* (16) 13-21.

Schattenberg A, de Witte T, Salden M, Vet J, Van Dijk B, Smeets D, Hoogenhout J, Haanen C (1989): Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood* 73(5), 1367-1372.

Schmid C, Kolb HJ (2007): Allogeneic stem cell transplantation in the management of acute myeloid leukemia. *Med Klin (Munich)* 102(4):317-323.

Schwenzer N, Ehrenfeld M (2002): Plastische und wiederherstellende Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M Hrsg. *Spezielle Chirurgie*. Stuttgart New York, Thieme-Verlag 380-381.

Serrano J, Román J, Sánchez J, Jiménez A, Castillejo JA, Herrera C, Gonzalez MG, Reina L, Rodriguez MC, Alvarez MA, Maldonado J, Torres A (2000): Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210BCR-ABL and p190BCR-ABL after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia: increasing mixed chimerism and p190 (BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 15:2659-2665.

Shimoni A, Nagler A, Kaplinsky C, Reichart M, Avigdor A, Hardan I, Yeshurun M, Daniely M, Zilberstein Y, Amariglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G, Trakhtenbrot L (2002): Chimerism testing and detection of minimal residual disease after allogeneic hematopoietic transplantation using the bioView (Duet) combined morphological and cytogenetical analysis. *Leukemia*. 16(8):1413-1422.

Stoetzer OJ, Straka M, Schleuning M, Kolb HJ (2001): Innovative Konzepte mit dosisreduzierten Konditionierungsprotokollen in der allogenen Stammzelltransplantation. *Tzm news* 2:5-9.

Tamura S, Saheki K, Takatsuka H, Wada H, Fujimori Y, Okamoto T, Takemoto Y, Hashimoto-Tamaoki T, Furuyama J, Kakishita E (2000): Early detection of relapse and evaluation of treatment for mixed chimerism using fluorescence in situ hybridization following allogeneic hematopoietic cell transplant for hematological malignancies. *Ann. Hematol.* 79, 622-626.

Tanaka K, Arif M, Eguchi M, Kumaravel TS, Ueda R, Ohno R, Iwato K, Kyo T, Dohy H, Kamada N (1997): Application of fluorescence in situ hybridization to detect residual leukemic cells with 9;22 and 15;17 translocations. *Leukemia*. 11(3):436-440.

Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Kleppe S, Beelen DW, Schaefer UW (2002): Mixed chimerism of bone marrow CD34+ progenitor cells (genotyping, bcr/abl analysis) after allogeneic transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Transplantation*. 74, 982-986.

Trakhtenbrot L, Reichart M, Shimoni A (2002): Chimerism testing and detection of minimal residual disease after allogeneic hematopoietic transplantation using the DuetTM (BioView) combined morphological and cytogenetical analysis. *Leukemia* 16:1419-1422.

Truong K, Boenders J, Maciorowski Z, Viehl P, Dutrillaux B, Malfroy B, Bourgeois CA (1997): Signal amplification of FISH for automated detection using image cytometry. *Anal Cell Pathol* 13: 137-146.

Udamaykura AM, Pathare AV, Al-Kindi S, Khan H, Rehmen JU, Zia f, Al-Ghazaly A, Nusrut N, Khan MI, Wali YA, Al-Lamki Z, Dennison D, Raeburn JA (2007): Cytogenetic, morphological, and immunophenotypic patterns in Omani patients with de novo acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 177(2):89-94.

Uzunel M, Jaksch M, Matisson J, Ringdén O (2003): Minimal residual disease detection after allogeneic stem cell transplantation is correlated to relapse in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 122:788-794

Van den Berg D, Wessman M, Murray L, Tong J, Chen B, Chen S, Simonetti D, King J, Yamasaki G, DiGiusto R, Gearing D, Reading C (1996): Leukemic burden in subpopulations of CD34+ cells isolated from the mobilized peripheral blood of alpha-interferon-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 15;87(10):4348-4357.

Varga D, Johannes T, Jainta S, Schuster S, Schwarz-Boeger U, Kiechle M, Garcia BP, Vogel W (2004): An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis* 19(5): 391-397.

Verma RS, Babu A (1994): Human chromosomes: principles and techniques. 2nd ed., McGraw-Hill, Inc.

Walshe J, Bishop MR (2004): Factors affecting engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells after reduced-intensity conditioning. *Cytotherapy* 6(6):589-582.

Wäsch R, Bertz H, Kunzmann R, Finke J (2000): Incidence of mixed chimaerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 109(4):743-750

Wessman M, Popp S, Ruutu T, Volin L, Cremer T, Knuutila S (1993): Detection of residual host cells after bone marrow transplantation using non-isotopic in situ hybridization and karyotype analysis. *Bone Marrow Transplant* 11:279-284.

Wilson WD, Tanious FH, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL; Strekowski L (1990): DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29(36):8452-8461.

Zeiser R, Spyridonidis A, Bertz H, Finke J (2005): Allogene Stammzelltransplantation für ältere Patienten mit akuter myeloischer Leukämie oder Myelodysplasie. *Dtsch Arztebl* 102(45): A-3098 / B-2616 / C-2457.

10 Abkürzungen

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AT	Alemtuzmab
ATG	anti T-Lymphozyten Antikörper
Bu	Busolfan
CCD-Kamera	charge-couple-device-Kamera (gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cep	Zentromer-Sonde
CML	chronisch myeloische Leukämie
Cyclo	Cyclophosphamid
DAPI	4'6'-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Flu	Fludarabin
g	Gramm
GvHD	graft versus host disease
GvL	graft versus leukemia
h	hour (Stunde)
HCl	Salzsäure
HLA	<u>h</u> uman <u>l</u> eucocyte <u>a</u> ntigen (Histokompatibilitätsantigen)
KCl	Kaliumchlorid
KMT	Knochenmarkstranplantation
l	Liter
LSI	locus specific identification
M	molar
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
nm	Nanometer

OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBSCT	peripheral blood stem cell transplantation (periphere Blutstammzelltransplantation)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Prof. Dr.	Professor Doktor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
SSC	standard saline citrate (Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat)
TBI	total body irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
Tx	Transplantation
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U/min	Umdrehung pro Minute
VK	Variationskoeffizient
μ l	Mikroliter
°C	Grad Celsius

Anhang

Übersicht des posttransplantären Chimärismusstatus aller Patienten

Tabelle 13: Ergebnis der posttransplantären Chimärismusanalyse

Patienten Nr.	Monate 1	nach 2	Tx 3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	2,3 %					+														
2	U ^{2,2%}	U ^{2,4%}			U ^{2,4%}															
4	U ^{3,0%}				2,8 %														+	
5	U ^{1,2%}	U ^{1,3%}		U ^{1,2%}		U ^{1,1%}	U ^{1,3%}													
6	U ^{2,3%}	U ^{2,3%}							U ^{1,2%}											
7						U ^{2,6%}					U ^{2,5%}				31,2 %	58 %				
8	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,3%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}				U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}		U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}		
9	U ^{2,5%}	U ^{2,4%}	U ^{2,7%}		U ^{2,4%}	U ^{2,4%}		U ^{2,3%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}		U ^{2,2%}	U ^{2,3%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}		U ^{2,5%}	U ^{2,5%}		
10		U ^{1,4%}	U ^{1,2%}		U ^{1,2%}															
11	16,3 %	U ^{2,1%}			4,8 %	9,5 %		U ^{2,1%}	U ^{2,2%}		U ^{2,5%}									
12	U ^{2,2%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	+																
13	U ^{1,2%}																			
14	U ^{1,2%}																			
15	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}				U ^{2,3%}				3,3 %	U ^{2,2%}	U ^{1,7%}		U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}
16	U ^{1,5%}	U ^{1,1%}	U ^{1,3%}	U ^{1,3%}	U ^{1,3%}	U ^{1,3%}	U ^{1,2%}	U ^{1,3%}		U ^{1,2%}			U ^{1,3%}	U ^{1,2%}		U ^{1,1%}	U ^{1,1%}		U ^{1,3%}	U ^{1,3%}
17	1,7 %	U ^{1,3%}			U ^{1,2%}										+					
18	9 %	U ^{1,2%}	U ^{1,2%}	U ^{1,2%}	1,8 %	6,8 %	1,3 %	1,8 %	+											
19	U ^{2,3%}	7,8 %	86 %	+																
20	U ^{1,3%}	U ^{1,1%}	+																	
21	U ^{2,3%}	U ^{2,1%}		U ^{2,3%}			U ^{2,3%}			U ^{2,3%}			U ^{2,2%}	U ^{2,1%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,3%}		U ^{2,3%}	U ^{2,3%}
22	U ^{1,3%}	+																		
23		U ^{0,7%}		U ^{0,6%}					U ^{0,7%}											
24	U ^{2,2%}		U ^{2,4%}	U ^{2,1%}	U ^{2,5%}		U ^{2,2%}			U ^{2,3%}		U ^{2,4%}	U ^{1,2%}	U ^{2,4%}	U ^{2,6%}		U ^{2,4%}		U ^{2,1%}	
25		U ^{2,0%}		U ^{2,1%}										U ^{2,4%}						
26			U ^{2,4%}	U ^{2,4%}										+						
27	U ^{1,2%}	U ^{1,3%}		U ^{1,2%}			U ^{1,2%}						U ^{2,4%}		U ^{2,2%}		U ^{2,4%}			
28	U ^{2,6%}	U ^{2,7%}		U ^{2,6%}		U ^{2,6%}	U ^{2,6%}		U ^{2,6%}											
29			U ^{2,1%}	U ^{2,2%}		+														
30					U ^{2,1%}															
31		U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{2,3%}	U ^{2,2%}	U ^{2,4%}	3,5 %	U ^{2,2%}	1,5 %	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,5%}	U ^{1,5%}				U ^{1,5%}	U ^{1,5%}	U ^{1,4%}	
32	U ^{2,4%}	U ^{1,7%}	0,2 %		U ^{2,1%}	U ^{2,6%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}	U ^{2,1%}		U ^{2,2%}	U ^{1,7%}	U ^{2,2%}	U ^{2,2%}					U ^{2,4%}	U ^{2,2%}
33	U ^{1,5%}	U ^{1,4%}	U ^{1,4%}						U ^{1,2%}		U ^{1,3%}	U ^{1,3%}	U ^{1,3%}	U ^{1,1%}			U ^{1,3%}		U ^{1,2%}	U ^{1,2%}
34											U ^{1,3%}									
35	U ^{1,3%}			U ^{1,8%}																
37	0,2 %	U ^{1,2%}	U ^{1,3%}	U ^{1,4%}	2,5 %	39 %		U ^{1,1%}		+										
38	0,4 %	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,2%}	U ^{1,1%}	U ^{0,9%}		U ^{0,9%}	U ^{1,2%}		U ^{0,9%}	U ^{1,3%}	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,3%}	U ^{1,2%}	U ^{1,2%}	U ^{1,3%}	U ^{1,2%}	
39	U ^{2,7%}				0,1 %				U ^{1,7%}		0,2 %	U ^{2,6%}		U ^{2,6%}	U ^{2,5%}		U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{1,3%}	U ^{1,2%}
40	U ^{3,0%}					U ^{2,6%}														
41	U ^{2,7%}	U ^{2,6%}	U ^{2,4%}	U ^{2,7%}	U ^{2,7%}		U ^{2,4%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}				U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,7%}	U ^{2,6%}
42	U ^{2,6%}	U ^{2,7%}	U ^{2,7%}	U ^{2,3%}		U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}	U ^{2,3%}	U ^{2,6%}	U ^{2,3%}	U ^{2,6%}	U ^{2,6%}			U ^{2,6%}		U ^{2,4%}	U ^{2,1%}
43	0,8 %	6 %	64 %	+																
44	U ^{2,2%}	U ^{2,1%}	U ^{2,4%}	U ^{2,3%}	U ^{2,2%}		U ^{2,3%}													
45	U ^{1,3%}	U ^{1,4%}	U ^{1,4%}	U ^{1,1%}																
46	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,2%}				U ^{0,9%}											
47	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}	0,3 %	U ^{1,7%}	U ^{1,7%}				U ^{1,7%}				U ^{1,3%}	92 %	+					
48											U ^{2,4%}	U ^{1,7%}				U ^{2,2%}				
49		U ^{1,2%}	1,2 %			U ^{0,6%}		U ^{0,7%}		U ^{0,7%}			U ^{1,0%}		U ^{0,6%}					
50	U ^{1,2%}			U ^{0,7%}		U ^{1,2%}							U ^{0,6%}							
51	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}	U ^{1,1%}	U ^{0,9%}	U ^{0,9%}		U ^{0,9%}		U ^{1,2%}		U ^{0,9%}		U ^{1,4%}	U ^{1,4%}		1 %	+		U ^{0,9%}	
52	U ^{2,2%}		U ^{2,3%}	U ^{2,5%}	U ^{2,3%}	U ^{2,4%}	U ^{2,2%}		U ^{2,2%}		U ^{2,3%}				U ^{2,2%}					
53	U ^{1,2%}	U ^{1,2%}		U ^{1,3%}		U ^{2,0%}	4,3 %			+										
54	U ^{0,6%}					2,4 %				20,6 %										
55	66,5 %	30 %	42,5 %	U ^{0,9%}																+
56		2,7 %			U ^{0,6%}			U ^{0,7%}						U ^{0,9%}						U ^{0,9%}
57	U ^{0,9%}		U ^{1,5%}		U ^{1,1%}															
58		U ^{0,6%}		U ^{0,6%}	U ^{0,6%}								+							
60	U ^{0,7%}	U ^{1,3%}			U ^{1,2%}			U ^{1,4%}		U ^{1,3%}										
61																				
62	U ^{2,3%}	U ^{2,4%}								U ^{2,4%}					U ^{1,7%}					

Gezeigt ist der posttransplantäre Verlauf ab Monat 1 bis 20. Die Nachweisgrenze wurde für jede Probe individuell abhängig von der Gesamtzahl gezählter Zellen bestimmt. Bei Proben, die mit U^{x%} markiert sind, ist der Anteil rezipienter Zellen unter der Nachweisgrenze von X%; mit „+“ ist der Todesmonat markiert.

Tabelle 14: Ergebnis der posttransplantären Chimärismusanalyse

Patienten Nr.	Monate 21	nach 22	Tx 23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	41	42*/44	48	49	52	54	55*/57	60*/64	72*/84
1																												
2																			U ^{1,8%}									
4																												
5																												
6																												
7	U ^{2,6%}																											
8	U ^{2,3%}		U ^{2,3%}				U ^{2,3%}		U ^{2,3%}					U ^{2,4%}	U ^{2,4%}		U ^{1,1%}											
9				U ^{2,2%}			U ^{2,3%}		U ^{2,4%}					U ^{2,4%}			U ^{2,2%}	U ^{2,4%}			U ^{2,2%*}						U ^{1,2%*}	
10																												
11																												
12																												
13																												
14																												
15	U ^{1,7%}			U ^{2,2%}						83 %	85 %			81 %														
16	U ^{1,3%}			U ^{1,2%}						U ^{1,2%}				U ^{2,2%}			U ^{1,2%}											
17																												
18																												
19																												
20																												
21			U ^{2,3%}	U ^{2,2%}					U ^{2,2%}					U ^{2,2%}														
22																												
23																												
24			U ^{2,2%}			U ^{2,2%}			U ^{3,0%}					U ^{1,1%}														
25																												
26																												
27																												
28				U ^{2,4%}					U ^{2,4%}					U ^{2,4%}						U ^{2,2%}						U ^{1,2%}		
29																												
30	U ^{1,5%}	U ^{1,3%}	U ^{1,3%}		U ^{0,9%}	U ^{0,9%}		U ^{1,3%}																				
31												U ^{2,2%}	+															
32																												
33				U ^{0,9%}																								
34			U ^{1,3%}					U ^{1,1%}													U ^{1,3%*}							
35																						U ^{1,4%}			U ^{1,3%}		U ^{1,2%}	U ^{1,2%}
36																												
37																												
38																												
39				U ^{1,1%}		U ^{1,1%}				U ^{1,1%}			U ^{1,1%}		U ^{1,3%}		U ^{1,2%}											
40		U ^{2,5%}											U ^{2,3%}															
41	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}				U ^{2,3%}		U ^{2,5%}		U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,4%}	U ^{2,5%}	U ^{1,7%}			U ^{2,2%}			U ^{2,2%}		U ^{2,2%*}	
42	U ^{2,3%}		U ^{2,4%}					U ^{2,4%}		U ^{2,4%}			U ^{2,3%}		U ^{2,3%}	U ^{2,4%}	U ^{2,1%}		U ^{2,4%}	U ^{2,2%}				U ^{1,3%}			U ^{1,2%*}	
43																												
44																												
45																												
47																												
48																												
49																												
50																												
51	U ^{0,9%}		U ^{0,9%}				U ^{0,9%}			U ^{0,9%}						U ^{0,9%}												
52	U ^{0,9%}																											
53																												
54																												
55																												
56																												
57																												
58																												
60																												
61																												
62																												

Gezeigt ist der posttransplantäre Verlauf ab Monat 21 bis 84. Die Nachweisgrenze wurde für jede Probe individuell abhängig von der Gesamtzahl gezählter Zellen bestimmt. Bei Proben, die mit U^{X%} markiert sind, ist der Anteil rezipienter Zellen unter der Nachweisgrenze von X%; mit „+“ ist der Todesmonat markiert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all denen aussprechen, die durch ihre Hilfsbereitschaft zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich:

- Prof. Dr. Uwe Claussen, dem Direktor des Instituts für Humangenetik, für die freundliche Aufnahme im Institut und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft,
- Dr. Ivan F. Loncarevic, meinem Betreuer, für die sofortige und schnelle Durchsicht der Arbeit und die wertvollen Anregungen,
- meinem Studienkameraden Dr. Johannes Lemke für die Vermittlung der Arbeit und die gemeinsame Zeit am Institut,
- Isabell Hartmann für ihre Geduld und Freundlichkeit. Durch ihre Hilfe habe ich das „FISHen“ erlernt. Sie ist die „gute Seele“ im Labor,
- der Firma MetaSystems GmbH, Altlußheim und hier besonders Herrn Tilman Johannes für die geduldige Beantwortung meiner Fragen zu Metafer,
- Dr. Martin Hofmann, Dr. Torsten Kroll und Dipl.-Ing. Alexander Gloria für die Unterstützung bei der statistischen Bewertung der Daten,
- PD Dr. Thomas Liehr für die Übernahme der Betreuung nach dem schockierenden Tod von Prof. Dr. Uwe Claussen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Carola und Jens Erlecke für Ihre langjährige moralische Unterstützung vor und während meines Studiums.

Besonders danken möchte ich auch meiner zukünftigen Frau Dr. Iris Renger, die mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt, mir während der Anfertigung der Arbeit den Rücken freigehalten und somit einen wesentlichen Anteil zum Gelingen beigetragen hat.

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen nicht in der Onlineversion.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. I. F. Loncarevic, T. Johannes, Dr. T. Kroll, Dr. M. Hofmann, Dipl.-Ing. A. Gloria,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.